

DIE ROLLE VON ABP1 IN DER AUSBILDUNG NEURONALER NETZWERK-INTEGRITÄT

**Dissertation zur Erlangung des akademischen
Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena**

von Luisa Mona Kraus

geboren am 03.01.1994 in Bamberg

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 Zusammenfassung.....	3
2 Einleitung	5
2.1 Morphologie und Organisation von Neuronen.....	5
2.2 Struktur und Funktion von dendritischen Dornfortsätzen	9
2.2.1 Morphologie dendritischer Dornfortsätze.....	9
2.2.2 Bildung dendritischer Dornfortsätze	10
2.2.3 Physiologische Eigenschaften dendritischer Dornfortsätze.....	11
2.2.4 Pathologische Veränderungen dendritischer Dornfortsätze	13
2.3 Das dynamische Aktincytoskelett in Neuronen	14
2.4 Aufbau und spezifische Funktion des Aktin-bindenden Proteins <i>Abp1</i> in Neuronen.....	17
3 Ziele der Arbeit	21
4 Material und Methoden	23
4.1 Material.....	23
4.1.1 Mauslinien	23
4.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	23
4.1.3 Antikörper und Farbstoffe	27
4.1.4 Geräte und Software	28
4.2 Methoden	30
4.2.1 Immunhistochemische Färbung von coronaren, adulten Mausgehirnschnitten nach der Free-Floating-Methode	30
4.2.2 Kultivierung und Immunfluoreszenzfärbung corticaler Neurone	30
4.2.3 Mikroskopie der immunhistochemischen Färbungen	31
4.2.4 Golgi-Färbung sagittaler, adulter Mausgehirnschnitte zur spezifischen morphologischen Auswertung	32
4.2.5 Hellfeldmikroskopie Golgi-gefärbter muriner Gehirnschnitte	33
4.2.6 Analyse der Golgi-Aufnahmen mithilfe der <i>Imaris8.0</i> -Software	34
4.2.6.1 Analyse dendritischer Dornfortsätze mithilfe der <i>Imaris8.0</i> -Software	34
4.2.6.2 Analyse corticaler Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex mithilfe der <i>Imaris8.0</i> -Software.....	37

4.2.7 Statistische Auswertung der Daten mittels Microsoft Excel [®] und Graph Pad Prism 7.0-Software	39
4.2.7.1 Statistische Auswertung der Dornfortsatzanalyse der Dendriten der CA1 Region des Hippocampus.....	39
4.2.7.2 Statistische Auswertung der Dendritenbaumanalyse der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex.....	40
5 Ergebnisse	41
5.1 Abp1 beeinflusst die Ausbildung dendritischer Dornen in der CA1 Region des Hippocampus	41
5.1.1 In Gehirnschnitten von Abp1-KO-Mäusen zeigt sich in der Immunfluoreszenz ein deutlich reduziertes Signal des anti-mAbp1-Antikörpers im Hippocampus	42
5.1.2 Abp1-KO-Mäuse zeigen verringerte Dornfortsatzdichten in der CA1 Region des Hippocampus.....	43
5.1.3 Dornfortsätze hippocampaler Dendriten zeigen morphologische Auffälligkeiten im Abp1-KO	45
5.2 Abp1-KO Mäuse zeigen morphologisch veränderte Dendritenbäume im Sensorischen Cortex	48
5.2.1 In Gehirnschnitten von Abp1-KO-Mäusen zeigt sich in der Immunfluoreszenz ein geringeres Signal des anti-mAbp1-Antikörpers im Sensorischen Cortex.....	49
5.2.2 In jungen murinen Cortexneuronen ist Abp1 in Wachstumskegeln angereichert..	51
5.2.3 Abp1-KO Mäuse besitzen eine reduzierte Komplexität des Dendritenbaumes in Schicht II/III des Sensorischen Cortex.....	52
5.2.4 Abp1-KO Mäuse besitzen eine reduzierte Komplexität des Dendritenbaumes in Schicht V des Sensorischen Cortex	56
6 Diskussion	59
6.1 Der Abp1-KO führt <i>in vivo</i> zu reduzierter hippocampaler Dornfortsatzdichte und zu morphologischen Veränderungen der Dornfortsatzköpfe	59
6.2 Der Abp1-KO verursacht in Schicht II/III und V des Sensorischen Cortex Dendritenbäume der Pyramidenzellen mit reduzierter Komplexität	67
6.3 Ist die Integrität des neuronalen Netzwerks unter Abp1-KO beeinflusst?	74
7 Schlussfolgerungen	77
8 Literaturverzeichnis	78
9 Anhang	87
9.1 Statistische Daten	87
9.1.1 Darstellung statistischer Details der Analyse dendritischer Dornfortsätze der Region CA1 des Hippocampus	87

9.1.2 Detaillierte Darstellung und statistische Details der Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex.....	90
9.1.3 Detaillierte Darstellung der Werte und statistische Details der Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex.....	92
9.2 Ergänzendes Abbildungsmaterial.....	94
9.2.1 Darstellung der prozentualen Abweichungen der Analyse der Dornfortsätze der CA1 Region des Hippocampus	94
9.2.2 Darstellung der prozentualen Abweichungen der Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III und der Schicht V des Sensorischen Cortex	96
9.3 Abbildungsverzeichnis.....	98
9.4 Tabellenverzeichnis.....	100
9.5 Danksagung	101
9.6 Lebenslauf in tabellarischer Form	102
9.7 Ehrenwörtliche Erklärung	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abp1	Aktin-bindendes Protein 1
ADF-H	<i>actin-depolymerising factor homology</i>
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Arp2/3	<i>actin related Protein 2/3</i>
ASD	<i>autism spectrum disorders</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CA1	<i>Cornu Ammonis 1</i> des Hippocampus
CI	<i>confidence interval</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid
ddH ₂ O	bidistilliertes Wasser
DIV (6)	<i>days in vitro</i> (6)
gp	<i>guinea pig</i>
HBBS	<i>hanks balanced salt solution</i>
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
m	<i>mouse</i>
M	Mol
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MEM	<i>minimum essential medium</i>
min	Minuten
mM	Millimol
NeuN	<i>neurone specific nuclear protein</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat-Antagonist
n.s.	nicht signifikant
N-WASP	Neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
PB	<i>phosphate-buffer</i>
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i>

PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
ProSAP	<i>proline-rich-synapse-associated-protein</i>
PSD	<i>postsynaptic density</i>
rb	<i>rabbit</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SER	<i>smooth endoplasmatic reticulum</i>
Shank	SH3-Domänen und Ankyrin-Wiederholung-beinhaltendes Protein
SH3	Src-Homologie 3
UKJ	Universitätsklinikum Jena
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WAVE	<i>WASP-family verprolin homologous protein</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Der Plastizität neuronaler Strukturen des zentralen Nervensystems (ZNS) wird eine große Bedeutung für Gedächtnis- und Lernprozesse zugeschrieben.

Ein Strukturmerkmal des Gehirns, das für die Fähigkeit zur strukturellen Plastizität grundlegend sein könnte, ist die Morphologie der Neurone. Pyramidenzellen des Cortex und des Hippocampus zeichnen sich durch elaborierte Dendritenbäume aus. Diese Dendritenbäume ermöglichen durch einen hohen Grad an Vernetzung einen regen Informationsfluss. Der Informationsfluss erfolgt dabei an den dendritischen Synapsen. Das postsynaptische Kompartiment der Synapsen befindet sich größtenteils auf den dendritischen Dornfortsätzen. Hierbei handelt es sich um sehr kleine dendritische Zellauswüchse, deren Cytoskelett vorrangig aus Aktin, dessen Polymerisation und Depolymerisation durch unterschiedliche Akteure gesteuert wird, besteht. Ein Spieler dieser komplexen Maschinerie ist das Aktin-bindende-Protein 1 (Abp1), das indirekt die Aktinnukleation aktivieren und selbst F-Aktin binden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Abp1 in der Ausbildung dendritischer Dornfortsätze und der Ausbildung elaborierter Dendritenbäume anhand morphologischer Analysen Golgi-gefärbter Gehirnschnitte 25-Wochen alter Mäuse untersucht. Hierbei wurden die Ergebnisse der Auswertung von Wildtyp (WT) mit dem Abp1-*knockout* (KO) verglichen.

Die Morphologie dendritischer Dornfortsätze wurde in der *Cornu Ammonis 1* (CA1) Region des Hippocampus hinsichtlich der Parameter der Kopfweite und des Kopfvolumens des Dornfortsatzes sowie der Dornfortsatzlänge adressiert. Es konnte ein deutlicher Phänotyp des Abp1-KO beschrieben werden. Im Abp1-KO zeigten sich verkürzte dendritische Dornfortsätze in den Klassen der pilzförmigen, dünnen und filopodienähnlichen Dornfortsätze. Die Kopfweite sowie das Kopfvolumen der pilzförmigen und das Kopfvolumen der dünnen Dornfortsätze nahmen im Abp1-KO signifikant ab. Auch die Dichte der dendritischen Dornfortsätze sowie die prozentuale Verteilung einzelner Morphologieklassen wurde ausgewertet. Die Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus des Abp1-KO wiesen Dendriten mit deutlich verringerter Dichte der Dornfortsätze auf. Die Dichte der pilzförmigen, dünnen und filopodienähnlichen Dornen nahm im Abp1-KO signifikant ab. Die prozentuale Verteilung der pilzförmigen Dornfortsätze zeigt im Abp1-KO keine Veränderung,

wohingegen die relative Häufigkeit der filopodienähnlichen Dornen ab- und die Häufigkeit der stummelförmigen Dornen zunimmt.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung coronarer Gehirnschnitte wurde nachgewiesen, dass Abp1 sich *in situ* in den Dendriten der Pyramidenzellen der morphologisch analysierten Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex befindet. Zusätzlich wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt, dass Abp1 sich in den Wachstumskegeln junger, kultivierter Cortexneuronen der Maus anreichert.

Um die Komplexität der Dendritenbäume darstellen zu können, wurde sich auf die Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex, die zentrale Bedeutung in der Vernetzung des Neocortex einnehmen, fokussiert. Die Pyramidenzellen dieser Schichten zeigten im Abp1-KO eine geringere Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten. Auch war die Gesamtlänge des Dendritenbaumes beider Schichten im Abp1-KO reduziert. Die mittlere Segmentlänge pro Zelle war jedoch in beiden Schichten signifikant erhöht, während die mittlere Anzahl der Segmente pro Zelle signifikant erniedrigt war. Eine Auswertung des Gesamtvolumens und des mittleren Verzweigungswinkel des Dendritenbaumes ergab in Schicht V keine Ergebnisse, in Schicht II/III zeigte sich jedoch ein signifikant reduziertes Gesamtvolumen sowie ein signifikant vergrößerter Verzweigungswinkel. Zur weiteren Darstellung der Komplexität des Dendritenbaumes wurde eine Analyse nach Sholl durchgeführt, die in Schicht II/III bei Radii zwischen 10 μm und 60 μm signifikant weniger Schnittpunkte des Dendritenbaumes mit den Ringen der Analyse nach Sholl zeigte. In Schicht V wies die Analyse nach Sholl keine signifikanten Unterschiede auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der KO von Abp1 die Ausbildung dendritischer Dornfortsätze beeinflusst sowie zu weniger komplexen Dendritenbäumen corticaler Pyramidenzellen *in vivo* führt. Es konnte somit zum einen eine Grundlage für weiterführende strukturelle wie funktionale Untersuchungen zur Charakterisierung der Abp1-KO-Mäuse gewonnen werden. Zum anderen konnte eine Vorlage für die weitere Erforschung molekularer Ursachen neuropsychiatrischer Erkrankungen und mit ihnen assoziierter morphologischer Auffälligkeiten der Neurone des ZNS und ihren Dornfortsätze geliefert werden.

2 Einleitung

2.1 Morphologie und Organisation von Neuronen

Neurone sind die hochspezialisierten Zellen des Gehirns, die auf komplexe Art und Weise miteinander verknüpft und in mikroskopischen wie makroskopischen Netzwerken organisiert sind (Squire et al. 2003, Holtmaat und Caroni 2016).

Der Begriff „neuronales Netzwerk“ kann vielseitig definiert werden und soll in den Ausführungen dieser Arbeit die strukturelle Einheit der funktionell unterschiedlichen, neuronalen Strukturen des Säugetiergehirns auf makroskopischer und zellulärer Ebene beschreiben (Parker 2010). Die Fähigkeit des neuronalen Netzwerkes sich funktionell wie strukturell auf Umwelteinflüsse hin anzupassen, wird als Plastizität beschrieben (Pascual-Leone et al. 2011).

Die charakteristische Morphologie der Neurone mit dem zentralen Zellsoma, dem vom Zellsoma ausgehenden Dendritenbaum und dem einzelnen Axon ermöglicht einen gerichteten Informationsfluss von Neuron zu Neuron (Squire et al. 2003). Die Informationsverarbeitung kann dabei im Cortex auf horizontaler und vertikaler Ebene ablaufen (Feldmeyer 2012). Das bedeutet, dass die Neurone des Cortex sowohl in andere Regionen des Cortex als auch in subcorticale Regionen projizieren und von dort Afferenzen empfangen können (Leone et al. 2008). Die Ausdehnung sowie Verzweigung des Dendritenbaumes eines Neurons im Cortex ist abhängig vom zu verarbeitenden Input der afferenten Neurone (Jan und Jan 2010).

Der Cortex des Säugetierhirns gliedert sich entwicklungsgeschichtlich in verschiedene Abschnitte (Brodmann 1909, Squire et al. 2003, Welsch und Deller 2010). Der phylogenetisch jüngste Abschnitt ist der Neocortex, der den Großteil der Großhirnrinde ausmacht (Squire et al. 2003). Ein Teil des Neocortex, der Informationen sowohl vertikal als auch horizontal prozessiert, ist beispielsweise der occipital des *Gyrus präcentralis* gelegene Sensorische Cortex (Squire et al. 2003). Er wird bei Säugetieren wie Mensch und Maus historisch in sechs architektonisch unterschiedliche Zellschichten gegliedert (Welsch und Deller 2010, Brodmann 1909, Squire et al. 2003). Sie werden von der außen aufliegenden *Pia mater* nach innen in Schicht I (*Lamina molecularis*), Schicht II (*Lamina granularis externa*), Schicht III (*Lamina pyramidalis externa*), Schicht IV (*Lamina granularis interna*), Schicht V (*Lamina pyramidalis interna*) und Schicht VI (*Lamina multifomis*) gegliedert (Abbildung 1; A), wobei im Gehirn der Maus die Schichten II und die Schicht III zur Schicht II/III zusammengefasst

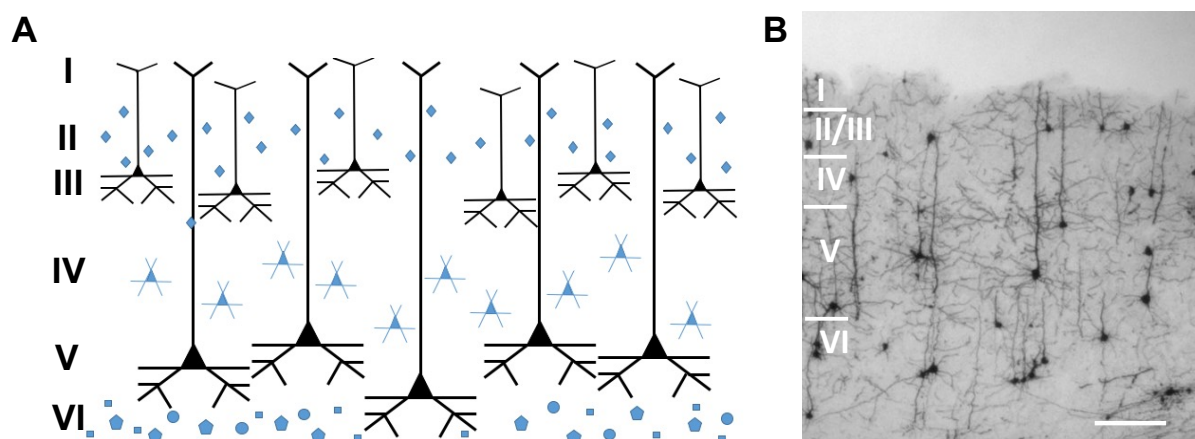


Abbildung 1 Sechsschichtiger Aufbau des Sensorischen Cortex

A Schematische Darstellung der Einteilung des Sensorischen Cortex in seine sechs zytologisch unterschiedlichen Schichten im Säugetier. **I** *Lamina molecularis*, **II** *Lamina granularis externa*, **III** *Lamina pyramidalis externa*, **IV** *Lamina granularis interna*, **V** *Lamina pyramidalis interna*, **VI** *Lamina multiformis*. Modifiziert nach Brodmann (1909) und Welsch und Deller (2010).

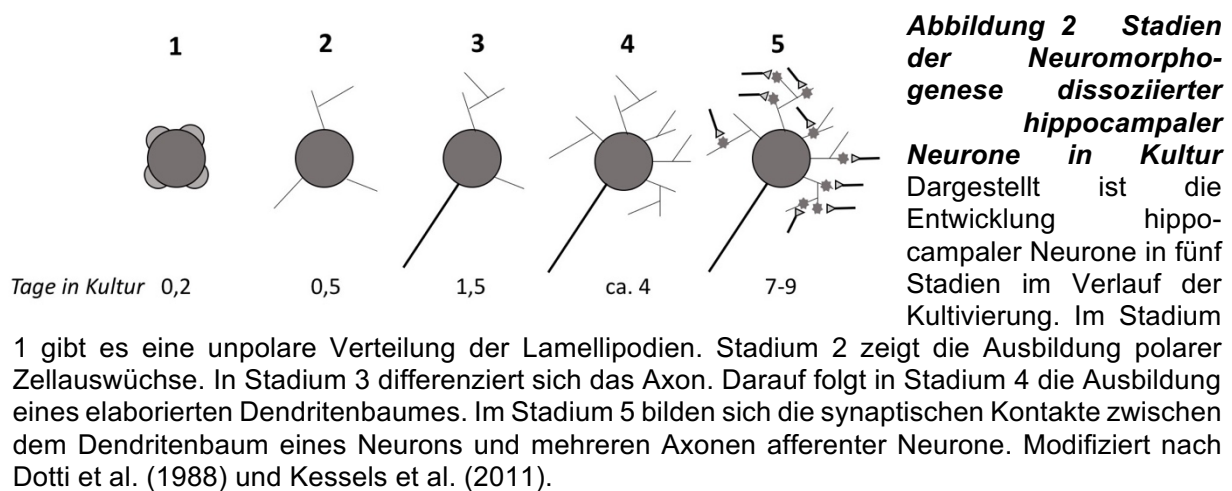
B Sagittaler Schnitt durch den Sensorischen Cortex einer wildtypischen, 25 Wochen alten Maus gefärbt nach der Golgi-Methode. Balken 200 µm.

werden (Abbildung 1; B). Die histologische Gliederung der Schichten entsteht vor allem durch die prominenten Zellkörper der Pyramidenzellen der Schichten II/III und V (Squire et al. 2003). Sie zeichnen sich durch einen typischen dreieckigen Zellkörper, von dem die Dendriten und das Axon abgehen, aus (Welsch und Deller 2010). Morphologische Aspekte des Dendritenbaumes wie die Anzahl der Dendriten, ihre Verzweigung und ihre Anzahl pro Zelle sowie die Dichte der Synapsen auf dem Dendrit sind wegweisend für die Funktion des Neurons im neuronalen Netzwerk (Lefebvre et al. 2015). Pyramidenzellen finden sich neben dem Cortex auch in anderen Regionen des Gehirns wie beispielsweise im Hippocampus (Amaral und Lavenex 2007). Die exzitatorischen Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex besitzen besonders elaborierte Dendritenbäume (Feldmeyer 2012, Chklovskii 2004) und haben distinkte Funktionen. Schicht II/III empfängt intercorticale Assoziationsfasern und projiziert in andere Cortexregionen während Schicht V ebenfalls Assoziationsfasern verarbeitet, aber in tiefere Regionen wie beispielsweise den Thalamus projiziert (Welsch und Deller 2010, Leone et al. 2008).

Die komplexe Struktur der Dendritenbäume entsteht während der embryonalen Entwicklung im Rahmen der Differenzierung der Neurone, nachdem diese aus der Ventrikulärzone an ihren Bestimmungsort im Cortex gewandert sind (Kessels et al. 2011). In den ersten postnatalen Wochen kann eine Anpassung der Morphologie der

Dendritenbäume der Neurone stattfinden bevor die Morphologie im reifen neuronalen Netzwerk relativ stabil ist (Jan und Jan 2010).

Die Ausbildung der Dendriten und des Axons im Rahmen der frühen Neuromorphogenese wurde unter anderem von Dotti et al. (1988) anhand hippocampaler Neuronenkulturen beschrieben und von Kessels et al. (2011) in einem Review aufgearbeitet. Beschrieben werden von diesen Autoren fünf Stadien der Neuromorphogenese *in vitro* (Abbildung 2). Um Dendritenbäume formen zu können, ist zuerst ein Durchbrechen der kugelförmigen Zellgestalt nötig. Zunächst sind die wachsenden Neurone rund und zeigen eine unpolare Verteilung von Lamellipodien. Kurz danach entstehen in einem zweiten Stadium zylindrische Auswüchse mit distalen Wachstumskegeln. Im dritten Stadium beginnt einer dieser Zellauswüchse erkennbar zum Axon zu werden. Darauf folgt im vierten Stadium die Bildung eines elaborierten Dendritenbaumes, die durch ein dynamisches Auf- und Abbauen der Zellfortsätze gekennzeichnet ist. Dieser Schritt läuft langsamer ab als die Vorhergehenden. Nach gut einer Woche in Kultur bilden sich in einem fünften Stadium die synaptischen Kontakte zwischen den Neuronen. Über die synaptischen Kontakte ist nun ein gerichteter Informationsfluss im neuronalen Netzwerk möglich (Dotti et al. 1988, Kessels et al. 2011).



Die Informationsübertragung von Neuron zu Neuron im neuronalen Netzwerk wird durch elektrochemische Synapsen ermöglicht (Sala und Segal 2014). Sie besitzen eine charakteristische subzelluläre Struktur und sind komplex organisiert (Bourgeois 2005, Walmsley et al. 1998). Eine Synapse ist aufgebaut aus der Präsynaptischen Endigung des Axons des einen Neurons, dem Synaptischen Spalt mit einer Breite von 20-30 nm (Wefelmeyer et al. 2016) und dem postsynaptischen Kompartiment auf der dendritischen Oberfläche eines zweiten Neurons. Zwischen diesen beiden

Kompartimenten kommt es durch Transmitterübertragung von Prä- zu Postsynapse zur Informationsweiterleitung auf das nachfolgende Neuron (Squire et al. 2003).

Im Gehirn der Säugetiere finden sich die meisten exzitatorischen Postsynapsen auf dendritischen Zellauswüchsen, die Dornfortsätze genannt werden (Penzes et al. 2011, Niesmann et al. 2011, Hering und Sheng 2001, Harris und Kater 1994, Bosch und Hayashi 2012, Alvarez und Sabatini 2007, Sala und Segal 2014).

2.2 Struktur und Funktion von dendritischen Dornfortsätzen

2.2.1 Morphologie dendritischer Dornfortsätze

Bei dendritischen Dornfortsätzen - oder kurz dendritischen Dornen - handelt es sich um Aktin-reiche Zellauswüchse (Sala und Segal 2014, Matus 1999, Kaech et al. 1997, Matus 2000, Bosch und Hayashi 2012), die sowohl lebenslang stabil sein als auch ständiger Veränderung unterliegen können, indem sie schrumpfen, wachsen oder ihre Morphologie ändern (Chen et al. 2014, Bosch und Hayashi 2012, Attardo et al. 2015, Alvarez und Sabatini 2007). Beschrieben wurden sie erstmals von Ramón y Cajal im 19. Jahrhundert (Ramon y Cajal 1888). Ab den 1950ern konnte man diese Strukturen dank elektronenmikroskopischer Methoden mit einer Auflösung von wenigen Nanometern untersuchen (Palay und Palade 1955, Gray 1959).

Dendritische Dornfortsätze sind zwischen $0,5\ \mu\text{m}$ und $2\ \mu\text{m}$ lange Zellauswüchse (Harris und Kater 1994, Chicurel und Harris 1992, Harris 1999). Sie weisen eine große Variabilität ihrer Form und Komplexität auf (Fiala et al. 2002). Generell besitzen sie einen dünnen Hals, auf dem ein prominenter Kopf sitzt (Harris und Kater 1994). Sie besitzen Volumina zwischen $0,01\ \mu\text{m}^3$ bis $1\ \mu\text{m}^3$, wobei die Köpfe der Dornfortsätze den Großteil des Volumens einnehmen (Sorra und Harris 2000, Harris 1999). Bei Betrachtung mittels Elektronenmikroskopie fallen unterschiedliche Formen der Dornfortsätze auf (Hering und Sheng 2001). Aufgrund ihrer Form und Größe werden die Dornfortsätze in verschiedene Morphologieklassen eingeteilt (Peters und Kaiserman-Abramof 1970, Hering und Sheng 2001). Man differenziert stummelförmige, pilzförmige, dünne und filopodienähnliche Dornen (Abbildung 3). Im adulten Säugetiergehirn nehmen die pilzförmigen und dünnen Dornfortsätze den größten Anteil ein (Fiala et al. 1998).

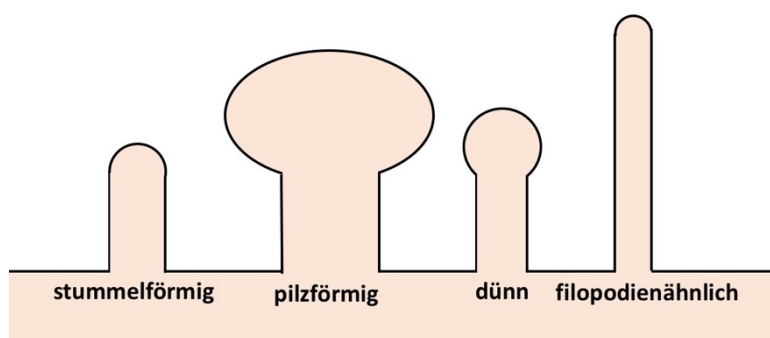


Abbildung 3 Morphologie und Klassifikation dendritischer Dornfortsätze
Aufgrund ihrer Form werden stummelförmige, pilzförmige, dünne und filopodienähnliche Dornen unterschieden. Modifiziert nach Hering und Sheng (2001).

Dornfortsätze mit klassischer pilzförmiger Morphologie werden als reif bezeichnet (Wefelmeyer et al. 2016, Hering und Sheng 2001, Chen et al. 2014, Bosch und Hayashi 2012, Penzes et al. 2011, Sala und Segal 2014, Sala et al. 2001, Harris 1999). Neben der Morphologie unterscheiden sich die einzelnen Dornfortsätze eines Dendriten bzw. eines neuronalen Netzwerks auch durch die Zellorganellen, die sie enthalten (Spacek und Harris 1997). Die meisten reifen Dornfortsätze zeichnen sich durch Polyribosomen und glattes Endoplasmatisches Retikulum (*smooth endoplasmatic reticulum*, SER), das mit dem Endoplasmatischen Retikulum des Dendriten verbunden ist (Spacek und Harris 1997, Spacek 1985, Gray 1959). In größeren Dornfortsätzen findet sich charakteristischer Weise mehr SER, das Dornenapparat genannt wird (Spacek 1985, Gray 1959).

2.2.2 Bildung dendritischer Dornfortsätze

Bei der Ausbildung dendritischer Dornfortsätze unterscheidet man die Entwicklung der Nervenzelle mit der Ausbildung des Dornfortsatz-besetzten Dendritenbaumes und die Ausbildung neuer Dornfortsätze im ausgereiften neuronalen Netzwerk (Yuste 2010). Die postnatale Entwicklung der Dornfortsätze pyramidalen Neurone anhand des *Miller-Peters-Modells* (Miller und Peters 1981) ist als ein in drei Schritten ablaufender Prozess beschrieben. Zunächst befinden sich die postsynaptischen Kompartimente der Synapsen des Individuums direkt auf der zylindrischen Oberfläche der Dendriten. Es kommt dann an der Synapse dann zur Volumenzunahme der präsynaptischen Endigungen durch die Akkumulation synaptischer Vesikel. Zeitgleich bilden sich an den postsynaptischen Kompartimenten auf den Dendriten stummelförmige Dornen aus. In der dritten und letzten Phase sind die meisten Dornfortsätze nicht mehr stummelförmig, sondern pilzförmig oder dünn. Sie besitzen einen charakteristischen Kopf und Hals und werden deshalb als ausgereift bezeichnet. Das Modell setzt die Ausbildung dendritischer Dornfortsätze unmittelbar mit der Ausbildung präsynaptischer Endigungen und somit der Synapsenbildung in Verbindung.

Andere Erklärungsansätze der Dornfortsatzbildung fokussieren sich auf die Rolle filopodienähnlicher Dornfortsätze (Yuste 2010, Hoogenraad und Akhmanova 2010, Papa et al. 1995, Ziv und Smith 1996, Hering und Sheng 2001). Sie besitzen keinen klassischen Dornfortsatzkopf und zeigen in Ultrastrukturaufnahmen in filopodienähnlichen Dornfortsätzen keinen typischen Dornenapparat der reifen Dornfortsätze (Fiala et al. 1998).

Diese Erklärungsansätze beruhen vorwiegend auf *in vitro* Analysen junger corticaler wie hippocampaler Neurone von Nagetieren (Ziv und Smith 1996, Papa et al. 1995, Miller und Peters 1981). Filopodien sind transiente dendritische Auswüchse, die in Kultur wenige Minuten bis mehrere Tage bestehen und anschließend verschwinden können, wobei ihr Verschwinden zeitlich mit der Entstehung persistenter, reifer Dornfortsätze korreliert. Während dieser Zeit in Kultur können sie aktiv Kontakt zu den Axonen anderer Neurone herstellen, indem sie Synapsen mit der präsynaptischen Endigungen Synapsen eingehen (Ziv und Smith 1996).

Die Verteilung der verschiedenen Morphologieklassen ist auch *in vivo* nicht zu jedem Entwicklungszeitpunkt gleich (Miller 1988, Miller 1986, Miller und Peters 1981). In frühen Entwicklungsstadien des neuronalen Netzwerks, gezeigt durch Analysen der Neurone wenige Tage alter Nagetiere, gibt es nachweislich vermehrt stummelförmige oder filopodienähnliche Dornfortsätze (Miller und Peters 1981, Fiala et al. 1998), die pilzförmigen Dornfortsätze mit ihrem prominenten Hals und Kopf überwiegen zu späteren Entwicklungszeitpunkten (Fiala et al. 1998). Die Ausbildung der filopodienähnlichen Dornfortsätze vor der Ausbildung der reifen Dornfortsätze (Fiala et al. 1998), ihre Fähigkeit zum Umbau zu reifen Dornfortsätzen mit Dornfortsatzkopf (Parnass et al. 2000) und ihre scheinbare Beteiligung an der Synapsenbildung (Ziv und Smith 1996) deuten auf eine Rolle im Rahmen der Synapsenbildung während der Entwicklung hin (Papa et al. 1995, Yuste und Urban 2004).

2.2.3 Physiologische Eigenschaften dendritischer Dornfortsätze

Ein Dornfortsatz trägt üblicher Weise eine elektrochemische Synapse (Harris und Kater 1994). Im postsynaptischen Kompartiment der dendritischen Dornfortsätze befinden sich Transmitterrezeptoren dicht gepackt in der sogenannten postsynaptischen Dichte (*postsynaptic density*, PSD) (Sheng und Hoogenraad 2007), die etwa 10% der Oberflächenstrukturen des Dornfortsatzes umfasst (Hering und Sheng 2001). Die PSD umfasst postsynaptische Rezeptoren, Kanäle, Signalmoleküle und Komponenten des Cytoskeletts (Kennedy 2000). Die Matrix der PSD wird unter anderem durch Proteine der Prolin-reiches Synapsen-assoziiertes Protein (*proline-rich-synapse-associated-protein*, ProSAP)/ Src-Homologie 3 (SH3)-Domänen und Ankyrin-Wiederholung-beinhaltendes Protein (Shank)-Familie, die mit den ionotropen Glutamaterezeptoren des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und des α -Amino-3-hydroxy-

5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA)-Typen verbunden sind, gebildet (Sheng und Kim 2000, Qualmann et al. 2004, Vessey und Karra 2007, Sheng und Hoogenraad 2007, Iasevoli et al. 2013). Die Bindung des Transmitters führt zur Konformationsänderung dieser Rezeptoren und nachfolgend zum Ioneneinstrom und zur Änderung des Membranpotentials, wodurch die Information zunächst innerhalb der Postsynapse und dann über den Dendrit und den Dendritenbaum zum Soma fortgeleitet werden kann (Lussier et al. 2015). Als Antwort auf die Exzitation der Postsynapse kommt es intrazellulär unter anderem zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Sabatini et al. 2001). Ca^{2+} reguliert postsynaptische Enzyme, die die synaptische Stärke steuern, und aktiviert Transkriptionsfaktoren, die langfristige Veränderungen der Proteinzusammensetzung bewirken (Bito et al. 1997). Die langanhaltende Erhöhung der synaptischen Stärke, auch *Long-Term-Potentiation* (LTP) genannt, und im Gegensatz dazu die langanhaltende Abschwächung der synaptischen Stärke, genannt *Long-Term-Depression* (LTD), werden als zelluläre Mechanismen des Lern- und Gedächtnisprozesses angesehen (Malinow und Malenka 2002, Malenka und Bear 2004, Bredt und Nicoll 2003).

Die synaptische Übertragung und die Plastizität der Synapsen sind essentiell für die Funktion und Weiterentwicklung des ZNS (Sheng und Hoogenraad 2007, Grabrucker et al. 2011). Auf zellulärer Ebene kann die Aktivität der synaptischen Strukturen morphologische Veränderungen der Dornfortsätze auslösen (Yuste und Bonhoeffer 2001, Kasai et al. 2003a) und somit strukturelle Plastizität der Dornfortsätze bedingen (Penzes et al. 2011). LTP führt zu einer größeren Dornfortsatzdichte und einem Wachstum der Dornfortsatzköpfe mit ihren PSDs (Matus et al. 2000, Malenka und Bear 2004, Bosch und Hayashi 2012), während es durch LTD zu gegenteiligen Effekten kommt (Malenka und Bear 2004, Bosch und Hayashi 2012). Die Größe des Dornfortsatzkopfes korreliert direkt mit der Größe der PSD sowie der Stärke der Synapse zur Informationsübertragung (Kasai et al. 2003b, Harris und Stevens 1989). Mittels zwei-Photonen-Mikroendoskopie konnten in lebenden, adulten Mäusen dynamische Veränderungen des Dornfortsatzbesatzes in der CA1 des Hippocampus über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen nachgewiesen werden (Attardo et al. 2015). In sich entwickelnden Neuronen in Kultur konnte mittels zwei-Photonen-Mikroendoskopie auch eine Veränderung der Morphologie der Dornfortsätze sowie

eine veränderte Verteilung der Morphologieklassen innerhalb nur weniger Stunden gezeigt werden (Parnass et al. 2000).

Veränderungen der Morphologie der Dornfortsätze gehen nachweislich auf die Aktivitäten des dynamischen Aktincytoskeletts zurück (Bosch und Hayashi 2012, Matus 2000), das sich in Abhängigkeit der Stimulation der postsynaptischen Rezeptoren in Sekunden verändern oder stabilisiert werden (Star et al. 2002).

2.2.4 Pathologische Veränderungen dendritischer Dornfortsätze

Quantitative Veränderungen der Dornfortsätze sowie Störungen ihrer Morphologie spielen auch für die Pathogenese neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Schizophrenie, Autismus-Spektrum-Störungen (*autism spectrum disorders*, ASD) oder Alzheimer eine entscheidende Rolle (Penzes et al. 2011, Fiala et al. 2002). Eine spezifische Abnahme der Dornfortsatzdichte in gewissen Hirnregionen finden sich bei Alzheimer, Epilepsie, Alkoholabusus, mentaler Retardierung oder Schizophrenie (Fiala et al. 2002). Die Dornfortsätze an Schizophrenie-erkrankter Patienten sind verglichen mit gesunden Individuen im Striatum auch morphologisch verändert und sind nachweislich verkleinert (Roberts et al. 1996). In Hippocampus und Cortex von Alzheimer-Gehirnen wurde mittels Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung neben einer Abnahme der Dornfortsatzdichte auch eine Abnahme der Dichte der Synapsen auf den dendritischen Dornfortsätzen beschrieben (Walsh und Selkoe 2004).

Eine steigende Dornfortsatzdichte spezifischer Hirnregionen wie etwa auf den Dendritenbäumen der Pyramidenzellen der Schichten II und V des temporalen, parietalen sowie frontalen Cortex zeigt sich hingegen bei Patienten mit ASD und wird mit verringerter kognitiver Funktion assoziiert (Fiala et al. 2002, Hutsler und Zhang 2010).

2.3 Das dynamische Aktincytoskelett in Neuronen

Das Cytoskelett der Neurone ist ein komplexes Gebilde, das aus verschiedenen miteinander agierenden Strukturkomplexen besteht und die Morphologie der Neurone bestimmt (Kirkpatrick und Brady 1999).

Das Aktincytoskelett reguliert wichtige zelluläre Prozesse der Neurone des Gehirns wie beispielsweise die Migration der Neuroepithelzellen während der Entwicklung (Lian und Sheen 2015, Svitkina 2013, Squire et al. 2003). Es bestimmt durch Ausbildung von Zellauswüchsen nicht nur das Zell- und Dendritenwachstum (Svitkina 2013, Squire et al. 2003, Kessels et al. 2011) sondern nimmt auch in der Ausbildung dendritischer Dornfortsätze eine wichtige Rolle ein (Sala und Segal 2014, Matus 2000, Matus 1999, Bosch und Hayashi 2012, Kaech et al. 1997). Entscheidend ist dabei die räumliche und zeitliche Regulation der Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin (Lee und Dominguez 2010). Grundsätzlich kommt Aktin in zwei Formen vor: Als monomeres, kugelförmiges G-Aktin und als polymeres, filamentöses F-Aktin (Holmes 2009).

Die Aktinfilamente (F-Aktin) sind 5-7 nm dick und bestehen aus zwei Ketten globulärer Monomere bestehende helikale Polymere. Diese Filamente winden sich in Form einer linksgängigen Helix umeinander (Holmes et al. 1990). Der Prozess der Polymerisation läuft in mehreren Schritten ab (Pollard und Cooper 1986). Es wird aufgrund der Polarität des G-Aktins ein (+)- und ein (-)-Ende des wachsenden Filaments unterschieden. Netto findet weder Polymerisation noch Depolymerisation statt, wenn die Konzentration des G-Aktins in der Zelle zwischen den kritischen Konzentrationen des (+)- und (-)-Endes liegt (Wegner 1976). Dieses Phänomen wird als Tretmühlenmechanismus bezeichnet (Pollard und Cooper 1986). Nach der initialen Assoziation der Aktinmonomere zu instabilen Dimeren kommt es zur Bildung eines Trimers, an das sich zur Filamentbildung weitere Aktinmonomere anlagern (dos Remedios et al. 2003)

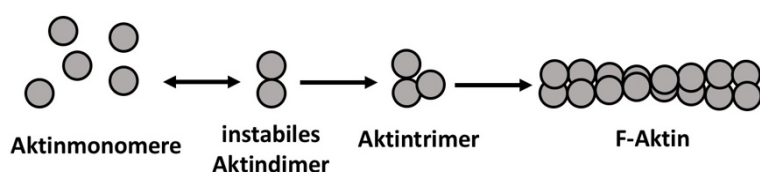


Abbildung 4 Bildung von F-Aktin aus Aktinmonomeren (G-Aktin) Die Abbildung zeigt vereinfacht die Bildung von filamentösem Aktin (F-Aktin) aus Aktinmonomeren (G-Aktin) über die Zwischenstufe der instabilen Aktindimere.

(Abbildung 4). Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Pollard und Cooper 1986). Da die Bildung der Intermediate für die Zelle energetisch

ungünstig ist (Dominguez 2010), sind *in vivo* weitere über verschiedene Mechanismen wirkende Proteine - sogenannte Nukleatoren - nötig, um die Monomere räumlich zusammenzuführen (Qualmann und Kessels 2009, dos Remedios et al. 2003).

Solche Nukleatoren sind beispielsweise die bereits gut verstandenen Formine mit ihrer *Formin-Homology 2* Domäne (FH2) und die Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)-*Homology 2* Domäne (WH2) -basierten Nukleatoren (Dominguez 2010). Nukleatoren mit multiplen Aktin-bindenden WH2-Domänen umfassen beispielsweise Spire (Quinlan et al. 2005) oder Cordon-Bleu (Cobl) (Ahuja et al. 2007). Der am längsten bekannte Nukleator ist der aus den zwei namensgebenden Proteinen Arp2 und Arp3 sowie weiteren fünf Untereinheiten ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 und ArpC5 bestehende *actin-related protein 2/3* (Arp2/3)-Komplex (Goley und Welch 2006, Welch et al. 1997, Machesky et al. 1994).

Der Arp2/3-Komplex steuert die Verzweigung von Aktinfilamenten (Svitkina 2013, Welch et al. 1997, dos Remedios et al. 2003, Goley und Welch 2006). Der Arp2/3-Komplex sorgt dabei für die Polymerisation eines neuen Aktinfilaments im 70°-Winkel zu einem bereits bestehenden Aktinfilament (Svitkina 2013, Kessels et al. 2011, Goley und Welch 2006) (Abbildung 5). Das Wachstum des dynamischen Aktincytoskelett durch den Arp2/3-Komplex wird dendritische Nukleation genannt (Pollard und Borisy 2003, Goley und Welch 2006). Der Mechanismus der dendritischen Nukleation liegt der Ausbildung von neuronalen Lamellipodien zugrunde (Squire et al. 2003, Svitkina et al. 2003)

Der Arp2/3-Komplex wird wiederum durch verschiedene weitere Akteure in seiner Aktivität beeinflusst (Goley und Welch 2006, Pollard 2007, Pollard und Borisy 2003).

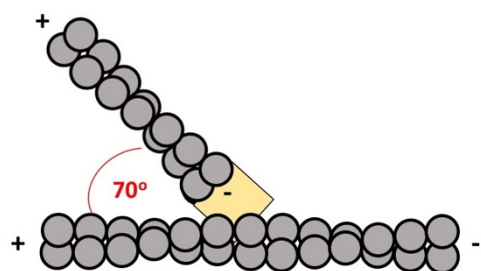


Abbildung 5 Verzweigung von Aktinfilamenten durch den Arp2/3-Komplex Dargestellt sind die (+)- und (-)- Enden der Aktinfilamente sowie der Arp2/3-Komplex (*gelb*). Modifiziert nach Kessels et al. (2011).

Ausschlaggebend für Aktivierung des Arp2/3-Komplex ist die G-Aktin bindende WH2-Domäne der aktivierenden Proteine (Mullins et al. 1998). Solche Aktivatoren sind beispielsweise das neuronale Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) sowie weitere Proteine der WASP/*WASP-family verprolin homologous protein* (WAVE)-Familie (Dominguez 2010, Takenawa und Miki 2001), oder Scar1 (Machesky und Insall 1998). Extrazelluläre Signale wie die Bindung von

Wachstumsfaktoren können über G-Proteine an N-WASP oder Scar1 weitergeleitet werden und so die Aktinpolymerisation regulieren (Zalevsky et al. 2001, Machesky und Insall 1998). N-WASP befindet sich vor Aktivierung im autoinhibierten Zustand (Pollard 2007). Ein akzessorisches Protein, das unter anderem N-WASP, Proteine der WASP/WAVE-Familie (Pinyol et al. 2007) und Scar1 (Koch et al. 2012) binden und die dadurch die Aktivität dieser Proteine regulieren kann, ist das Aktin-bindende Protein 1 (Abp1).

2.4 Aufbau und spezifische Funktion des Aktin-bindenden Proteins *Abp1* in Neuronen

Das Protein mAbp1 (*mouse* oder *mammilian* Abp1), im Folgenden auch als Abp1 bezeichnet, wurde als Ortholog des Aktin-bindenden Proteins 1 der Hefe (Drubin et al. 1988) im Säugetier identifiziert (Kessels et al. 2000). Es wurde in Säugetieren zunächst als SH3P7 bezeichnet, nachdem es in einem Screening auf SH3-Domänen enthaltende Proteine entdeckt wurde (Sparks et al. 1996). Es wird nicht nur in lymphatischen Geweben wie Thymus und Milz (Connert et al. 2006) sondern auch in Lunge und Hoden (Kessels et al. 2001) sowie ubiquitär im Gehirn exprimiert (Qualmann et al. 2004).

Abp1 akkumuliert in wachsenden Zellauswüchsen wie Lamellipodien, in denen das dynamische Aktincytoskelett aktiv ist, während es in ruhenden Zellen uniform verteilt ist (Drubin et al. 1988, Kessels et al. 2000). In Neuronen befindet es sich sowohl in der Präsynapse als auch in deutlich höheren Konzentrationen in der Postsynapse (Yamazaki et al. 2001, Kessels et al. 2001).

Das Protein hat eine relative molekulare Masse von 55 kDa (Larbolette et al. 1999). Mit der N-terminalen *actin-depolymerizing factor homology* (ADF-H)-Domäne sowie mit geringer Affinität mit der helikalen Domäne, die sowohl positiv geladene als auch negativ geladene Anteile enthält, bindet es F-Aktin (Lappalainen et al. 1998, Larbolette et al. 1999, Kessels et al. 2000) (Abbildung 6). Das N-terminale Ende kann außerdem Lipide wie beispielsweise Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3), die in großen Mengen in der Zellmembran vorkommen, binden (Koch et al. 2012).

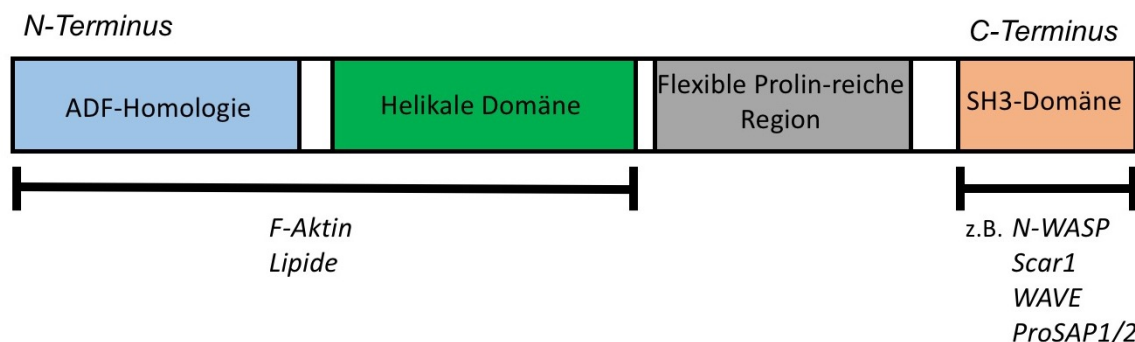


Abbildung 6 Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Abp1 im Säugetier
Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Abp1 mit Hervorhebung der Bindungsstellen beschriebener Interaktionspartner. Modifiziert nach Kessels et al. (2000), Koch et al. (2012), Larbolette et al. (1999) und Lappalainen et al. (1998).

Auf das N-terminale Ende folgt eine flexible Prolin-reiche Domäne und zwei Tyrosin-Phosphorylierungs-Motive, die als Substrat der Familie der Src- und Syk-Kinasen gelten (Lock et al. 1998, Larbolette et al. 1999). Am C-Terminus schließt sich eine SH3-Domäne an (Kessels et al. 2000).

Abp1 wurde als molekulare Schnittstelle zwischen membrantopologischen Veränderungen und dem Aktincytoskelett beschrieben (Qualmann et al. 2004, Pinyol et al. 2007, Koch et al. 2014, Koch et al. 2012, Kessels et al. 2001, Haeckel et al. 2008). Verschiedene Komponenten der Aktinpolymerisationsmaschinerie interagieren mit Abp1 darunter die Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes N-WASP und Scar/WAVE (Takenawa und Miki 2001), die Abp1 über die SH3-Domäne bindet (Pinyol et al. 2007, Koch et al. 2012). Über die direkte Bindung löst Abp1 die Autoinhibition von N-WASP, was zur Interaktion von N-WASP mit dem Arp2/3-Komplex und der Aktivierung des Arp2/3-Komplex führt (Pinyol et al. 2007). Ein WH2-Domänen-basierter Aktinnukleator, mit dem Abp1 für die Neuromorphogenese wichtige Komplexe bildet, ist Cobl (Haag et al. 2012). Über die Interaktion mit dem Aktincytoskelett hinaus bindet Abp1 mit der ADF-H-Domäne und der helikalen Domäne Lipide und assoziiert mit der Zellmembran (Koch et al. 2012). Abp1 kann durch die SH3-Domäne die postsynaptisch angereicherten und mit den postsynaptischen Rezeptoren verbundenen Proteine der ProSAP/Shank-Familie wie ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3 in der PSD binden und besitzt dadurch die Fähigkeit, die PSD mit dem Aktincytoskelett zu verbinden (Qualmann et al. 2004).

Eine Überexpression von Abp1 in kultivierten hippocampalen Rattenneuronen führte sowohl zu erhöhter Dichte der pilzförmigen Dornfortsätze als auch zu erhöhter Dichte der Synapsen. Eine erniedrigte Dornfortsatzdichte wurde unter *knockdown* von Abp1 beobachtet (Haeckel et al. 2008). Da zum einen durch Abp1 die PSD mit dem Aktincytoskelett verbunden wird (Qualmann et al. 2004) und die Proteine der PSD an der Kopfbildung beteiligt sind (Sala et al. 2001, Haeckel et al. 2008) und zum anderen durch die Interaktion von Abp1 mit N-WASP der Arp2/3-Komplex aktiviert wird (Pinyol et al. 2007), könnten neu polymerisierte Aktinfilamente im Dornfortsatz durch Abp1 stabilisiert werden (Abbildung 7). Abp1 wird so eine Rolle in der Bildung von Dornfortsätzen und Synapsen zugeschrieben (Haeckel et al. 2008).

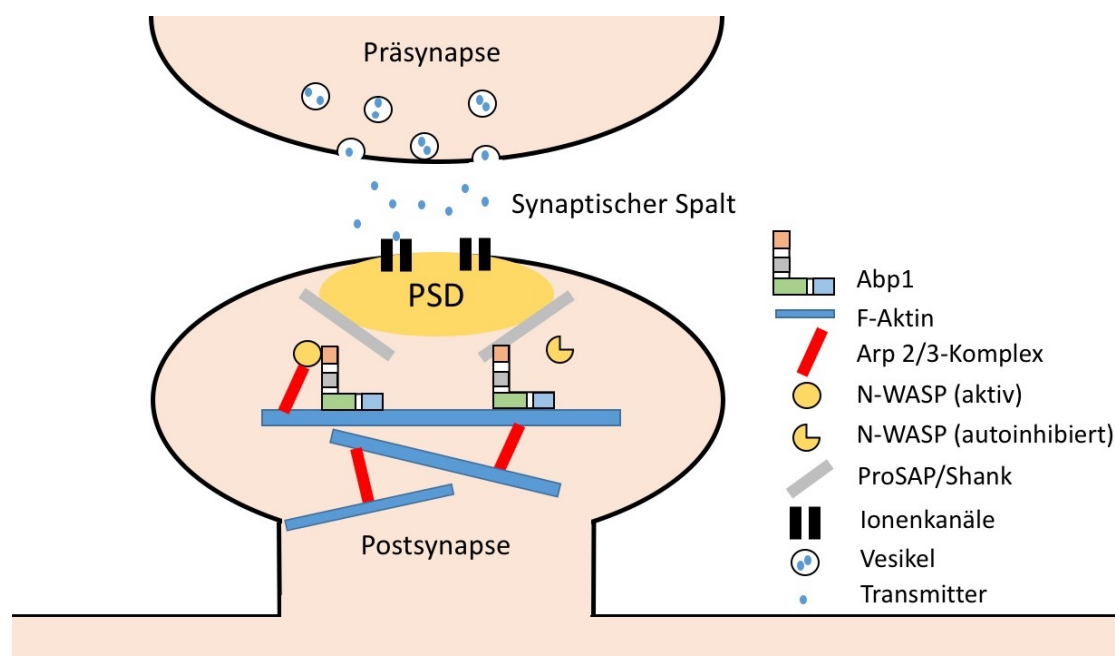


Abbildung 7 Verknüpfung der PSD und des Aktincytoskeletts durch Abp1 im postsynaptischen Kompartiment der Dornfortsätze Dargestellt ist das Schema einer elektrochemischen Synapse, in der Informationsübertragung über Transmitterfreisetzung von der Präsynapse zur Postsynapse stattfindet. Das Postsynaptische Kompartiment zeigt hier einen Ausschnitt der Interaktionen von Abp1 mit F-Aktin, dem Arp2/3-Komplex, N-WASP und Proteinen der ProSAP/Shank-Familie. Modifiziert nach Haeckel et al. (2008).

Präsynaptisch interagiert die SH3-Domäne von Abp1 mit dem synaptischen Vesikelprotein Synapsin 1, der GTPase Dynamin 1 (Kessels et al. 2001, Kessels et al. 2000) sowie dem Gerüstprotein Piccolo, einem Protein der präsynaptischen Matrix der Aktiven Zone (Fenster et al. 2003). Über die Interaktion mit Dynamin, das an der Reorganisation der Zellmembran und der Clathrin-gesteuerten im Rahmen der Endocytose beteiligt ist (Sever et al. 2000), dient Abp1 als Verbindung des Aktincytoskeletts mit dem Apparat der Endocytose (Kessels et al. 2001).

Neben der Interaktion mit dem dynamischen Aktincytoskelett besitzt Abp1 in Lymphozyten andere spezielle Funktionen. Als Substrat der Src- und Syk-Kinasen, die bei Antigen-Bindung an den Rezeptoren der Lymphozyten aktiviert werden (Reth und Wienands 1997), scheint Abp1 sowohl im Signalweg der B-Zell-Rezeptoren als auch im Signalweg der T-Zell-Rezeptoren eine Rolle zu spielen (Larbolette et al. 1999).

Abp1-KO-Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar. Milz, Herz und Lunge dieser Tiere sind bei drei Monate alten Individuen abnorm verändert. Die Wiederaufnahme von

Transmittern aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptischen Vesikel der axonalen Endigung nach der Ausschüttung ist in hippocampalen Neuronen dieser Tiere gestört (Connert et al. 2006).

Eine Charakterisierung postsynaptischer Funktionen der Abp1-KO-Mäuse gibt es aktuell nicht.

3 Ziele der Arbeit

Die Plastizität der Neurone des Gehirns, die es dem Organismus erlaubt, zu lernen und sich an die Umwelt anzupassen, ist Gegenstand aktueller, neurowissenschaftlicher Forschung. Die Synapsen, deren postsynaptische Kompartimente größtenteils auf dendritischen Dornfortsätzen zu finden sind, übertragen Informationen gerichtet von Zelle zu Zelle. Eine große Zahl an Synapsen ermöglicht einen regen Informationsfluss. Ein komplexer Dendritenbaum mit einer Großzahl an Synapsen kann demnach als ein Zeichen der Netzwerk-Integrität gesehen werden.

Die Strukturgebung des Dendritenbaumes sowie die Ausbildung und Morphologie der dendritischen Dornfortsätze sind abhängig vom dynamischen Aktincytoskelett. Ein akzessorisches Protein, das F-Aktin binden sowie indirekt die Aktinnukleation beeinflussen kann, ist Abp1. Eine regulierte Anpassungsfähigkeit des Cytoskeletts ist nötig, um die Morphologie des gesamten Neurons an Anforderungen der Umwelt wie etwa einen veränderten Informationsfluss anzupassen.

Störungen der Netzwerk-Integrität und –Funktion werden im Zusammenhang mit neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen untersucht. Um die Lücke zwischen zellulären Veränderungen und klinischen Symptomen zu schließen, ist es nötig, das gesamte neuronale Netzwerk hinsichtlich seiner Morphologie und Physiologie zu betrachten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine Abp1-Defizienz zu morphologischen Auffälligkeiten der Dendritenbäume und Dornfortsätze führt wie sie im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen beschrieben werden. Es sollen sagittale, Golgi-gefärbte Gehirnschnitte von 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen in Hippocampus und Cortex miteinander verglichen werden. Die dendritischen Dornfortsätze der Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus sollen hinsichtlich ihrer Dichte und ihrer Morphologie in WT und Abp1-KO analysiert werden. Um eine Aussage über mögliche Auffälligkeiten der Morphologie der Dornfortsätze des Abp1-KO treffen zu können, sollen die Parameter Kopfweite des Dornfortsatzes, Kopfvolumen des Dornfortsatzes und die Dornfortsatzlänge ausgewählt werden. Um weiterführend Einflüsse von Abp1 auf die Ausbildung und Funktion des gesamten neuronalen Netzwerkes und die zugrundeliegende Dendritogenese zu adressieren, werden die Dendritenbäume corticaler

Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex untersucht. Der Sensorische Cortex soll aufgrund seiner Größe, seiner leicht auffindbaren Lage und zentralen Rolle für die sensorischen Funktionen des Nervensystems ausgewählt werden. Im Rahmen der Auswertung soll versucht werden, die Struktur der Dendritenbäume durch Analyse der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle, der Länge des Dendritenbaumes, der mittleren Länge der Segmente, der mittleren Anzahl der Segmente, des Gesamtvolumens des Dendritenbaumes und des mittleren Verzweigungswinkels darzustellen. Zusätzlich soll eine Analyse nach Sholl durchgeführt werden. Es soll angestrebt werden, eine Aussage über die Komplexität durch eine Analyse der Verzweigungen der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex zu treffen.

Ziel der Arbeit ist es, die Struktur und die Komplexität der Neuronen von WT und Abp1-KO anhand messbarer, zellmorphologischer Parameter im adulten Mausgehirn postmortal festzuhalten. Die Auswertungen sollen somit neue Erkenntnis über die Rolle des akzessorischen Proteins Abp1 in der Ausbildung von Dendriten und ihren Dornfortsätzen liefern. Es könnten somit Grundlagen für zukünftige Untersuchungen cytoskelettaler Strukturen und deren Rolle in der Ausbildung mit neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziierter neuronaler Morphologie geliefert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Mauslinien

Die Abp1-KO-Mausmutante wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (Connert et al. 2006) generiert und das entstandene Allel als BALB/c- $\text{Dbnl}^{\text{tm1Jwnd}}$ (mAbp1^-) charakterisiert. Anschließend wurde sie der AG Kessels, Institut für Biochemie I des Universitätsklinikums Jena (UKJ), zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Gehirnschnitten von Geschwistertieren der Maus (*Mus musculus*) durchgeführt. Es wurden jeweils drei 25 Wochen alte, männliche WT-Mäuse ($\text{Dbnl}^+/ \text{Dbnl}^+$) und drei Abp1-KO-Mäuse ($\text{Dbnl}^{\text{tm1Jwnd}} / \text{Dbnl}^{\text{tm1Jwnd}}$) für die Golgi-Färbung sowie jeweils eine WT-Maus und eine Abp1-KO-Maus für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

BSA	New England Biolabs [®] Inc. GmbH, Ipswich, Massachusetts, USA
B-27 [®] Serum-Free Supplement (50×)	Gibco [®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAPI	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fluoromount-G [™]	Southern-BioTech, Birmingham, Alabama, USA
Gelantine	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
GlutaMAX [™] Supplement (100x)	Gibco [®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin (100x)	Gibco [®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Gibco [®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Minimum essential medium (MEM)	Gibco [®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Neurobasal[®]-A Medium

Gibco[®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Pferdeserum

Gibco[®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Permunt[®]

Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Massachusetts, USA

Triton[®] X-100

Roth, Karlsruhe

Xylol

Roth, Karlsruhe

Ziegennormalserum

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kits

FD Rapid GolgiStain[™] Kit FD

Neuro Technologies Inc., Columbia,
Maryland, USA

Lösungen und Puffer

Beschichtungslösung

für Objektträger

0,05 % (w/v) $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

0,30 % (w/v) Gelatine

erhitzt auf 60°C

Blockierlösung A

(für Immunfluoreszenzfärbung fixierter
muriner Gehirnschnitte)

5 % (v/v) Ziegennormalserum

0,25 % (v/v) Triton[®] X-100

0,1 M PB

Blockierlösung 1 (pH 7,4)

(für Immunfluoreszenzfärbung kultivierter
Neurone)

0,1 % (v/v) Triton-X 100

2 % (w/v) BSA

10 % Pferdeserum in 1x PBS

Blockierlösung 2 (pH 7,4)

(für Immunfluoreszenzfärbung kultivierter
Neurone)

0,2 % (v/v) Triton-X 100

2 % (w/v) BSA

10 % Pferdeserum in 1x PBS

Blockierlösung 3 (pH 7,4)

(für Immunfluoreszenzfärbung kultivierter
Neurone)

2 % (w/v) BSA

10 % Pferdeserum in 1x PBS

Färbelösung

(zur Golgi-Färbung gemäß
des FD Rapid GolgiStain™ Kit)

Lösung D, Lösung E und bidestilliertes
Wasser im Verhältnis 1:1:2

Imprägnierungslösung

(zur Golgi-Färbung gemäß
des FD Rapid GolgiStain™ Kit)

Lösung A und Lösung B im
Verhältnis 1:1

Mausneuronenmedium

(30 ml angesetzt für 4 Deckgläschen;
Verluste durch steriles Pipettieren
wurden vorab berücksichtigt)

29,04 ml Neurobasal® A
0,30 ml 200 mM GlutaMAX™ (100x)
0,50 ml B-27®
0,06 ml 10 % (v/v) Pferdeserum
0,30 ml 5 mM β -Mercaptoethanol-
Stock (3,49 μ l β -Mercaptoethanol in
10ml Neurobasal®-A)
7 ml Überstand aus
Rattenneuronenmedium

Mowiol

10 % Mowiol 4-88
25 % Glycerol in 100 mM TrisHCl
(pH 8,5)

4%iges PFA

40 g PFA in 1l PBS (pH 7,4)

1x PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10,13 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

0,1 M PB

154,80 ml 0,5 M Na₂HPO₄
22,60 ml 1 M Na₂HPO₄
aufgefüllt auf 1l mit H₂O

<i>Platingmedium</i> (zur Kultivierung corticaler Neurone)	10 % (v/v) Pferdeserum MEM mit 20 % (w/v) Glucose
<i>Quenchlösung</i>	25 mM Glycin 0,5 mM CaCl_2 0,5 mM MgCl_2 in 1 x PBS
Rattenneuronenmedium	500 ml Neurobasal [®] -A 1,25 ml 200 mM GlutaMAX [™] (100x) 10 ml B-27 [®] 5 ml Penicillin (100 Units/ml) 5 ml Streptomycin (100 µg/ml) 5 ml Glutamat-Stock (2,5 mM L-Glutamin (100x) in H_2O)
4%ige Saccharose-Lösung	4 % (w/v) Saccharose in PBS
<i>Trypsin-Lösung</i> (zur Kultivierung corticaler Neurone)	10 mM HEPES 1 x Penicillin (100 Units/ml) 1 x Streptomycin (100 µg/ml) 1 x Trypsin-EDTA (0,05 %) in HBSS

Sonstiges Material

<i>Feuchte Kammer</i>	Metallbox ausgelegt mit feuchten Tüchern und Parafilm
-----------------------	---

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen VWR (Radnor, Pennsylvania, USA), Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Sigma-Aldrich[®] (Hamburg) bezogen.

4.1.3 Antikörper und Farbstoffe

Die verwendeten Antikörper, aufgeführt in Tabelle 1 und Tabelle 2, sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, polyklonal und gegen die leichte Kette von IgG gerichtet.

Vor Verwendung wurden die verdünnten Antikörperlösungen jeweils für 1 min mit $16100 \times g$ Umdrehungen zentrifugiert und aus dem Überstand unter Vermeidung von Lichtexposition abpipettiert.

Tabelle 1 Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti-mAbp1	mAbp1 AS 282-370 (flexible Domäne)	Meerschweinchen	1:200	(Kessels et al. 2000)
anti-MAP2	Mikrotubuli- assoziiertes Protein 2	Kaninchen	1:500	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA
anti-NeuN (monoklonal)	<i>neuronal- nuclear antigen</i>	Maus	1:100	Merck KGaA Millipore, Billerica Massachusetts, USA

Tabelle 2 Verwendete sekundäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Gekoppelt mit	Anregung/ Emissions- maximum	Verdünnung	Quelle
anti- Kaninchen	Ziege	AlexaFlour™ 350	350 nm / 442 nm	1:1000	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
anti-Maus	Esel	AlexaFlour™ 568	568 nm / 603 nm	1:1000	
anti-Meer- schweinchen	Ziege	AlexaFlour™ 488	488 nm / 525 nm	1:1000	

4.1.4 Geräte und Software

Kryostat

Open-Top-Kryostat CM 3050S

Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Mikroskope

Epifluoreszenzmikroskop

Axio ObserverZ.1 mit Apotom
mit Kamera AxioCam MRm CCD
Cell Observer SD
mit *spinning disc* CSU-X1A 5000
mit Kamera AxioCam MRm CCD

Carl-Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena

Carl-Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena

Carl-Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena

Carl-Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena

Konfokales Laser-Scanning Mikroskop

LSM Leica TCS SP5

Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Software

AxioVision Rel. 4.8-Software

Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena

GraphPad Prism 7.0-Software

GraphPad Software Inc., La Jolla,
Kalifornien, USA

Imaris8.0-Software

Bitplane AG, Zürich, Schweiz

LAS AF 3

Leica Microsystems GmbH, Nussloch

ZEN-Software

Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena

Vortexer

Vortex-Genie[®] 2

Karl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Waagen

BA110S

Sartorius AG, Göttingen

Wippschüttler

Edmund Bühler WS5

Edmund Bühler GmbH, Hechingen

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415D

Eppendorf AG, Hamburg

Wichtige VerbrauchsmaterialienAssistent Pasteurpipetten, lange
Form, 230 nmGlaswarenfabrik Karl Hecht GmbH &
Co.KG, SondheimCellstar[®] 24-well-ZellkulturplatteGreiner Bio-One GmbH,
FrickenhausenCellstar[®] 12-well-ZellkulturplatteGreiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen

Deckgläschen

Gerhard Menzel GmbH,
BraunschweigEinweg-Pasteurpipetten, graduiert
Eppendorf Safe-Lock[™] Gefäße
(1,5 ml; 2 ml)Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf AG, HamburgFalcon-Gefäße
(15 ml und 50 ml)

Grale HDS, Melbourne, Australien

Objektträger

Gerhard Menzel GmbH,
Braunschweig

Alle hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen VWR (Radnor, Pennsylvania, USA), Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Sigma-Aldrich[®] (Hamburg) bezogen.

4.2 Methoden

4.2.1 Immunhistochemische Färbung von coronaren, adulten Mausgehirnschnitten nach der Free-Floating-Methode

Die 55 µm dicken, coronaren Schnitte wurden durch Dr. Nicole Koch, Institut für Biochemie I des UKJ, aus adulten Mausgehirnen hergestellt, PFA-fixiert und für die Immunfluoreszenzfärbung bereit gestellt.

Für die Färbung wurden die Schnitte in eine jeweils mit 500 µl Phosphatpuffer (*phosphate-buffer*, PB) gefüllte 24-*well*-Platte überführt. Der PB wurde danach mit einer Pasteurpipette vorsichtig entfernt und jeweils 500 µl Blockierlösung A hinzugegeben. Die Schnitte wurden dann 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Später wurde die Blockierlösung A durch 300 µl der Blockierlösung A mit den primären Antikörpern (*gp-anti-mAbp1*, *m-anti-NeuN* und *rb-anti-MAP2*) in entsprechender Verdünnung (Tabelle 1) ersetzt und für 24 Stunden bei 4°C auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Schnitte mehrfach kurz bei RT mit 500 µl PB gewaschen. Jetzt wurden 400 µl Blockierlösung A mit den sekundären Antikörpern in entsprechender Verdünnung (Tabelle 2) sowie dem Farbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:2000 hinzugegeben. Nun erfolgte eine Inkubation auf dem Wippschüttler bei 4°C über Nacht. Die Schnitte wurden nachfolgend erneut mit PB gewaschen. Sie wurden anschließend mit dem Pinsel auf einen Objektträger aufgebracht, wobei darauf geachtet wurde, die Schnitte nicht austrocknen zu lassen. Die Schnitte wurden dann mit Fluoromount-GTM bedeckt, in der Dunkelheit bei RT getrocknet und bei 4°C gelagert.

4.2.2 Kultivierung und Immunfluoreszenzfärbung corticaler Neurone

Die Mausneurone aus Hippocampus und Cortex wurden von Michaela Öhler und Dr. Nicole Koch, Institut für Biochemie I des UKJ, auf Deckgläschen kultiviert und für die Immunfluoreszenzfärbung zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte nach der in der Arbeitsgruppe etablierten Methode (Schneider 2014). Anschließend wurden die Neurone bis zur Immunfluoreszenzfärbung in 1 ml Mausneuronenmedium unter sterilen Bedingungen weiterkultiviert.

Die zuvor in 12-well-Platten überführten Neurone wurden im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung zunächst mit 1 ml 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) und 4 % (m/v) Saccharose für 5 min fixiert. Dann wurde für 20 min mit 1 ml Quenchlösung gefolgt von 1 ml Blockierlösung 2 für 1 Stunde inkubiert. Jetzt folgte die Inkubation der Proben in 100 µl der Blockierlösung 3, versetzt mit primären Antikörpern (*gp-anti-Abp1*, *rb-anti-MAP2*) in entsprechender Verdünnung (Tabelle 1), für 1,5 Stunden bei RT in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Blockierlösung 3 für jeweils 5-10 min gewaschen. Nun wurde die sekundäre Antikörperlösung aus der Blockierlösung 3 und den sekundären Antikörpern in entsprechender Verdünnung (Tabelle 2) hergestellt. Die Proben wurden mit 100 µl der sekundären Antikörperlösung bei RT in der feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde mit der Blockierlösung 3 sowie zwei Mal mit Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) für jeweils 10-15 min gewaschen. Die Deckgläser wurden in Mowiol eingebettet, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstehen. Anschließend erfolgte die Trocknung bei RT und die Lagerung bei 4°C.

4.2.3 Mikroskopie der immunhistochemischen Färbungen

Die Mikroskopie der gefärbten, coronaren Gehirnschnitte erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop unter Verwendung der Objektive TCS SP5 HC PL FLUOTAR 10x und HCX PLAPO CS 20x und am Cell Observer SD. WT und Abp1-KO wurden mit derselben Laserintensität aufgenommen. Anregung und Emission des an den sekundären Antikörper gekoppelten Farbstoffes sind Tabelle 2 (4.1.3) zu entnehmen. Die Aufnahme der Färbung mit DAPI erfolgte bei einer Anregung von 359 nm und einer Emission von 461 nm.

Die Mikroskopie der corticalen Neurone erfolgte am Axio ObserverZ.1 unter Verwendung des Apotoms. Einzelne Einstellungen wurden mithilfe der ZEN-Software gespeichert.

4.2.4 Golgi-Färbung sagittaler, adulter Mausgehirnschnitte zur spezifischen morphologischen Auswertung

Die modifizierte Golgi-Färbung (Glaser und Van der Loos 1981) wurde durch Michaela Öhler, Institut für Biochemie I des UKJ, an den unfixierten Gehirnen 25 Wochen alter Mäuse durchgeführt, wobei jeweils drei WT- und drei Abp1-KO-Mäuse verwendet wurden. Die Gehirne wurden nachfolgend von der Schädelkalotte präpariert und mittels FD Rapid GolgiStain™ Kit (*FD Neuro Technologies*) angefärbt. Dazu wurde jedes Gehirn kurz mit ddH₂O gewaschen und in ein mit Alufolie umwickeltes 50 ml Falcon-Gefäß gegeben und dieses mit 2-3 ml Imprägnierungslösung aus Lösung A+B gefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Imprägnierungslösung entfernt und durch 5 ml frische Imprägnierungslösung ausgetauscht. Nun wurden die Gehirne für 20 Tage bei RT inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Überführung in frische Falcon-Gefäße gefüllt mit 5 ml der Lösung C und anschließend die Inkubation bei 4°C für 24 Stunden. Dann wurde die Lösung C erneuert und die Gehirne wurden für 4-5 Tage bei 4°C inkubiert. Eine detaillierte Beschreibung des Färbeprozesses ist dem Benutzerhandbuch des Herstellers zu entnehmen.

Nach der Färbung wurden ebenfalls durch Michaela Öhler am Kryostat Leica CM 3050S 40 µm dicke, sagittale Gehirnschnitte angefertigt.

Zuvor wurden die Objektträger, auf die später die Schnitte aufgebracht wurden, mit Gelantine überzogen. Dafür wurden die Objektträger mit Seifenwasser, ddH₂O und dann mit 70 % (v/v) Ethanol-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Trocknung staubfrei über Nacht. Der Objektträger wurde nachfolgend 3 mal in die zuvor auf 60°C erhitzte Beschichtungslösung getaucht. Schlussendlich wurden sie staubfrei abgedeckt und 48 Stunden bei RT getrocknet.

Zu Beginn des Schneidevorgangs wurden die Gehirne für 2 min in ein mit Isopentan gefülltes Gefäß auf Trockeneis gehalten. Danach wurden die Gehirne in einer Petrischale für 5 min auf Trockeneis gestellt und bei -80°C gelagert. Die Temperatur des Kryostats wurde auf -30°C gestellt und die Gehirne im Kryostat eingespannt. Nach dem Schneidevorgang wurden die Objektträger mit einem Tropfen der Lösung C versehen und die Schnitte auftragen. Die überschüssige Lösung wurde mit einem Filterpapier entfernt. Es folgte die Trocknung bei RT und anschließend die Lagerung bei RT für 3 Tage.

Nach 3 Tagen Lagerung wurde ein Teil der Lösungen D und E des FD Rapid Golgi Stain™ Kit (*FD Neuro Technologies*) (jeweils 50 ml mit 2 Teilen ddH₂O (100 ml) zu einer Färbelösung vermischt. Die Schnitte wurden zunächst vorsichtig 2 min mit ddH₂O abgewaschen und danach 10 min in die Färbelösung eingelegt. Daraufhin folgte zweimaliges Waschen mit ddH₂O für 4 min. Nun erfolgte die Trocknung in einer Ethanolreihe (50 %, 75 %, 95 %, 4 mal 99 % (v/v)) für jeweils 4 min. Nach anschließender dreimaliger Reinigung der Schnitte mit Xylol für jeweils 4 min wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit Permount□ eingedeckt.

Während des gesamten Färbevorgangs wurde darauf geachtet, die Gewebe nicht austrocknen zu lassen und sie Licht-geschützt zu lagern. Anschließend wurden die Objektträger bei RT gelagert.

4.2.5 Hellfeldmikroskopie Golgi-gefärbter muriner Gehirnschnitte

Die sagittalen Hirnschnitte in 40 µm Dicke wurden am Axio ObserverZ.1 im Hellfeld mithilfe der AxioVision Rel. 4.8-Software aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten in Z-Stapeln mit einem Abstand von 0,280 µm im Hippocampus und 1 µm im Sensorischen Cortex. Somit wurde für die Analyse der Dornfortsätze im Hippocampus der Verlauf einzelner Dendriten sekundärer oder höherer Ordnung aufgenommen. Es wurden so aus drei WT-Tieren und drei Abp1-KO-Tieren insgesamt 91 Dendriten im WT und 90 Dendriten im Abp1-KO zur Auswertung herangezogen.

Für die Analyse der Dendritenbäume wurden ganze Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex aufgenommen, sodass der Verlauf des gesamten Dendritenbaumes festgehalten werden konnte. So wurden für die spätere Auswertung in Schicht II/III insgesamt 92 Zellen des WT und 92 Zellen des Abp1-KO und in Schicht V insgesamt 89 Zellen des WT und 90 des Abp1-KO aufgenommen.

4.2.6 Analyse der Golgi-Aufnahmen mithilfe der *Imaris8.0*-Software

4.2.6.1 Analyse dendritischer Dornfortsätze mithilfe der *Imaris8.0*-Software

Die mit 63-facher Vergrößerung aufgenommenen Dendriten wurden mithilfe der *Imaris8.0*-Software hinsichtlich verschiedener Aspekte analysiert. Zunächst wurde das Bild mittels der Funktion *Invert* invertiert, sodass anschließend durch die Funktion *Background-Subtraction* (Filter-Weite: 35,5 μm) der Hintergrund reduziert wurde. Dendriten mit einem Durchmesser von 0,6 μm bis 1,2 μm wurden manuell vermessen. Hierfür wurde mittels der Funktion *Draw Autopath* und einem vorgegebenen Durchmesser von 1,2 μm der Startpunkt des zu analysierenden Dendritenabschnitts manuell festgelegt. Das Programm berechnete den Verlauf eines Filaments, dessen Ende vorab ebenfalls manuell bestimmt wurde. Als Filament wurde im Rahmen der Analyse der Dornfortsätze der manuell bestimmte Abschnitt des Dendriten, dessen Dornfortsätze später ausgewertet wurden, bezeichnet. Mithilfe des *Shortest-Distance*-Algorithmus wurde die mittlere Dicke des Filaments bei einem *Threshold* von 0,8 nochmals korrigiert. Das Filament wurde nun zentriert und mehrfach geglättet, um den durch die Software generierten Verlauf des Filaments dem eigentlich Verlauf des Dendriten anzupassen. Unter Vorgabe der Grenzwerte für die Maße der zu analysierenden Dornfortsätze des Dendriten (Länge bis 5 μm , Kopfweite mindestens 0,2 μm) in 3D-Ansicht wurden die Dornfortsätze vom Programm ausgewählt und die bei Markierung von Artefakten manuell angepasst. Auch wurden einzelne Dornfortsätze, falls nötig, nachträglich mittels *Smooth*-Funktion geglättet. Anschließend wurde noch einmal mittels *Shortest-Distance*-Algorithmus mit einem *Threshold* von 0,6, um den mittleren Durchmesser der Dornfortsätze noch genauer festzulegen, angewendet.


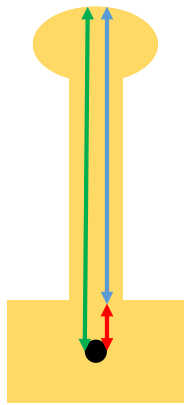
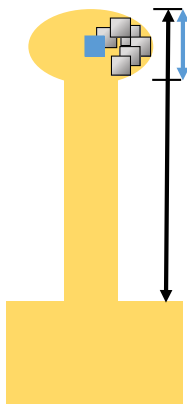
An dieser Stelle wurde nun das Tool *Classify Spines* angewendet, um die markierten Dornfortsätze der entsprechenden Morphologiekategorie zu zuordnen. Tabelle 3 zeigt die Parameter des in die Software integrierten Klassifizierungsmoduls (*MATLAB*-Modul).

Tabelle 3 Klassifikation der Dornfortsätze durch das integrierte MATLAB-Modul

Klasse	Parameter gemäß der Imaris8.0-Software		Befehl
	Dornfortsatzlänge	Kopfweite	
Stummelförmig	$\leq 0,75 \mu\text{m}$	Enden mit oder ohne Kopf	<code>length(spine): < = 0.75</code>
Pilzförmig	$0,75 - 5 \mu\text{m}$	$> 0,5 \mu\text{m}$	<code>length(spine): > 0.75 and max_width(head) > 0.5</code>
Dünn	$0,75 - 5 \mu\text{m}$	$\leq 0,5 \mu\text{m}$ und $> 0,3 \mu\text{m}$	<code>length(spine): > 0.75 and max_width(head) < = 0.5 and max_width(head) > 0.3 and mean_width(neck) < max_width(head)</code>
Filopodienähnlich	$0,75 - 5 \mu\text{m}$	Kein Kopf abgrenzbar	<code>True</code>

Anschließend wurden die Ergebnisse der Auswertung durch die *Imaris8.0*-Software als Microsoft Excel-Datei für jede Morphologiekategorie (stummelförmig, pilzförmig, dünn oder filopodienähnlich) einzeln exportiert, sodass es nachfolgend möglich war morphologische Parameter für jeden einzelnen Dornfortsatz entsprechend seiner Morphologiekategorie separat auszuwerten. Im Rahmen der Untersuchung wurden die Werte für die Dornfortsatzlänge, Kopfweite des Dornfortsatzes und des Kopfvolumens des Dornfortsatzkopfes aller ausgewählten Dornfortsätze erfasst. Eine vereinfachte Beschreibung dieser morphologischen Parameter sowie ihre direkte Bezeichnung durch die *Imaris8.0*-Software sind in Tabelle 4 aufgezeigt. Details und Voreinstellungen sowie angewandte Formeln zur Berechnung der Parameter können dem Benutzerhandbuch der *Imaris8.0*-Software entnommen werden.

Tabelle 4 Beschreibung und direkte Bezeichnung der untersuchten morphologischen Parameter im Rahmen der Dornfortsatzanalyse Dargestellt und beschrieben sind die ausgewerteten Parameter wie im Handbuch der *Imaris8.0*-Software definiert. In eckigen Klammern stehen die direkt in der Software verwendeten englischen Namen der Parameter.

<p>Kopfweite des Dornfortsatzes</p> <p>[Spine Part Mean Diameter Head]</p>	<p>Der mittlere Durchmesser des Dornfortsatzkopfes (<i>dicker blauer Pfeil</i>) wird errechnet als Mittelwert aus dem minimalen und dem maximalen Durchmesser (<i>schwarze Pfeile</i>).</p>	
<p>Dornfortsatzlänge</p> <p>[Spine Length]</p>	<p>Die Strecke vom zentralen Ursprung des Dornfortsatzes am Dendrit (<i>schwarzer Kreis</i>) zum Ende des Dornfortsatzkopfes (<i>grüner Pfeil</i>) minus des durchschnittlichen Radius des Dendriten (<i>roter Pfeil</i>) entspricht der Dornfortsatzlänge (<i>dicker blauer Pfeil</i>).</p>	
<p>Kopfvolumen des Dornfortsatzes</p> <p>[Spine Part Mean Volume Head]</p>	<p>Das Volumen des Dornfortsatzkopfes wird aus der Anzahl der einzelnen Voxel (<i>blaues Quadrat</i>), die den Dornfortsatzkopf in 3D-Rekonstruktion ausfüllen (<i>angedeutet durch die grauen Quadrate</i>), berechnet. Das Volumen eines Voxels ist fix definiert.</p> <p>Der Durchmesser des Dornfortsatzkopfes ist dabei als 1/4 der Dornfortsatzlänge definiert (<i>blauer Pfeil</i>).</p>	

4.2.6.2 Analyse corticaler Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex mithilfe der Imaris8.0-Software

Die Analyse der in 20-facher Vergrößerung aufgenommenen corticalen Pyramidenzellen der Schichten II/III und V wurde nach demselben Prinzip für beide Schichten semimanuell durchgeführt.

Zunächst wurde das Bild durch die Funktion *Invert* invertiert und mittels *Baseline Subtraction* und *Background Subtraction* (Filter-Weite: 112 μm) der Hintergrund reduziert. Im *Filament-Tracer*-Modus wurde der Startpunkt des neuen Filaments manuell im Soma der auszuwertenden Zelle festgelegt und durch das Programm der Verlauf des Dendritenbaumes rekonstruiert. Hierbei wurden Dendritendurchmesser zwischen 2 μm und 16 μm akzeptiert und Unterbrechungen von 2 μm noch als

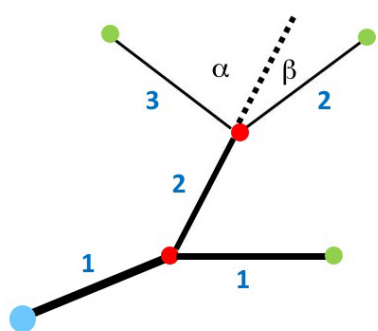


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Parameter der Dendritenbaumanalyse mittels der Imaris8.0-Software

Schwarze Balken spiegeln Segmente wider. Unterschiedliche Dicken der Balken stellen unterschiedliche Durchmesser dar. Die Summe aller Segmente bildet das Filament, das dem gesamten semi-manuell markierten Dendritenbaum der Zelle entspricht. Der größere blaue Punkt symbolisiert den Startpunkt, die roten kleinen Punkte sind dendritische Verzweigungspunkte, die Grünen Endpunkte. Arabische Zahlen bezeichnen das Verzweigungslevel. Sind die Durchmesser der Segmente identisch, wird der Verzweigungswinkel durch eine gedachte Verlängerung des ursprünglichen Segments (hier die gestrichelte Linie) errechnet, wobei das nachfolgende Segment mit dem kleineren Winkel (hier \square) das geringere Verzweigungslevel beibehält.

zusammenhängend angenommen. Nachträglich wurde die Auswahl des Programms kontrolliert und es wurde gegebenenfalls der Verlauf des Filaments der Zellstruktur angepasst sowie die einzelnen Segmente mittels der Funktion *Smooth* geglättet.

Für die Auswertung der Dendritenbäume durch die Imaris8.0-Software wurde eine spezielle Terminologie angewandt (Abbildung 8). Der semimanuell markierte Dendritenbaum der Zelle wurde im Rahmen der Dendritenbaumanalyse durch die Software als Filament bezeichnet. Der Abschnitt zwischen zwei dendritischen Verzweigungspunkten wurde als Segment bezeichnet, sodass sich das Filament aus der Summe aller Segmente ergab. Die Gesamtlänge des analysierten Filaments entspricht demnach der Gesamtlänge des Dendritenbaumes. Die Dendriten, die direkt vom Zellkörper abgingen, wurden als Dendriten des ersten Verzweigungslevels bezeichnet. Jeder Punkt, an dem sich der Dendrit aufteilte, wurde als dendritischer Verzweigungspunkt definiert. Dies galt ebenso für den Startpunkt. Für jedes abgehende

Segment ergab sich so ein Verzweigungswinkel. Dendriten des ersten Verzweigungslevels wurde ein Winkel von 0° zugeordnet, da diese von keinem vorgehenden Segment sondern vom Soma abgingen.

Verzweigungswinkel von 0° wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. An einer Verzweigung wurde der Dendrit mit dem kleineren Durchmesser mit steigendem Verzweigungslevel versehen. Waren die Durchmesser der Segmente identisch, wurden die Verzweigungswinkel beider Segmente wie oben beschrieben errechnet und zur Hilfe herangezogen, wobei das nachfolgende Segment mit dem kleineren Winkel das geringere Verzweigungslevel beibehielt.

Durch die *Imaris8.0*-Software wurde automatisch eine Analyse nach D. A. Sholl (Sholl 1953) (Abbildung 9) durchgeführt. Als Abstand, um den der Radius der konzentrischen Ringe ausgehend vom Startpunkt im Soma der Pyramidenzelle anwächst, lag bei $5\text{ }\mu\text{m}$. Um gegebenenfalls durch den Zellkörper entstehende Schnittpunkte auszuschließen, wurde die Analyse nach Sholl erst bei einem Radius von $10\text{ }\mu\text{m}$ begonnen. Die Analyse durch die *Imaris8.0*-Software wurde so weit durchgeführt wie der Gewebeerhalt dies zuließ. Als Ende der Auswertung wurde ein Radius von $100\text{ }\mu\text{m}$ festgelegt, da bei

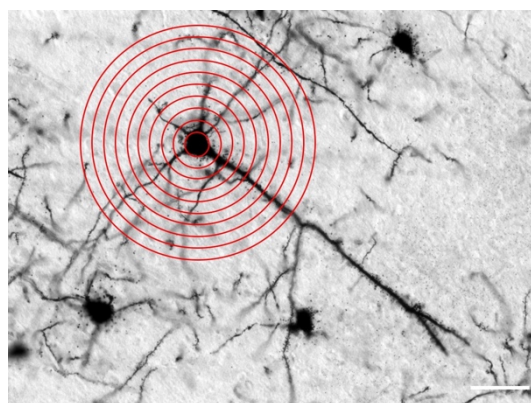


Abbildung 9 Darstellung des Prinzips der Analyse nach D. A. Sholl (Sholl 1953)

Im Rahmen der Analyse nach Sholl werden konzentrische Ringe mit stetig steigendem Radius (Abstand vom Startpunkt) über den Dendritenbaum des Neurons projiziert und die Anzahl der Schnittpunkte jedes Rings mit dem Dendritenbaum gezählt. Zur besseren Darstellung sind die konzentrischen Ringe hier mit einem Abstand von $10\text{ }\mu\text{m}$ dargestellt. Balken $50\text{ }\mu\text{m}$.

größeren Abständen vom Zellsoma die Struktur des Dendritenbaumes erschwert zu beurteilen war. Des Weiteren wurden die Werte für die Anzahl der Verzweigungslevel 1 bis 10, die Zahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle, die Länge des Dendritenbaumes der Zelle, die mittlere Segmentlänge pro Zelle, die mittlere Anzahl der Segmente pro Zelle, das Gesamtvolumen des Dendritenbaumes der Zelle und der mittlere Verzweigungswinkel pro Zelle durch die *Imaris8.0*-Software erhoben.

4.2.7 Statistische Auswertung der Daten mittels Microsoft Excel[®] und Graph Pad Prism 7.0-Software

4.2.7.1 Statistische Auswertung der Dornfortsatzanalyse der Dendriten der CA1 Region des Hippocampus

Um die Werte der *Imaris* 8.0-Software auszuwerten, wurde für jeden Genotyp eine Tabelle mithilfe von Microsoft Excel[®] erstellt, in die zunächst die Länge des manuell nachgezeichneten Dendriten - in der Software als Filament bezeichnet - sowie die Gesamtzahl aller Dornfortsätze des Filaments übernommen wurde. Daraus wurde die Gesamtdichte der Dornen für das entsprechende Segment berechnet. Des Weiteren wurde durch dasselbe Prinzip die Dichte der stummelförmigen, pilzförmigen, dünnen und filopodienähnlichen Dornen einzeln errechnet und nachfolgend ihr prozentualer Anteil an der Gesamtdichte bestimmt.

Weiterhin wurden für jeden Genotyp die Einzelwerte der Dornfortsatzlänge, der Kopfweite und des Kopfvolumens für jeden einzelnen Dornfortsatz entsprechend seiner Morphologiekategorie (stummelförmig, pilzförmig, dünn oder filopodienähnlich) untereinander gelistet. So konnten die Daten nach Morphologiekategorie und zu untersuchenden Parameter für den nachfolgenden Vergleich zwischen WT und Abp1-KO sortiert werden.

Mithilfe der *Graph Pad Prism* 7.0-Software wurden die Datensätze der Dichten aller Morphologiekategorien und die Datensätze der morphologischen Parameter zunächst einzeln auf eine Gauss'sche Verteilung (Normalverteilung) hin untersucht. Dazu wurde *D'Agostino-&-Pearson* (omnibus K^2) Test angewendet. Konnte eine Normalverteilung angenommen werden, wurden die Daten von WT und Abp1-KO mithilfe des zweiseitigen, ungepaarten *student's t-test* verglichen. Konnte hingegen für die Daten beider Genotypen keine Normalverteilung nachgewiesen werden, kam der zweiseitige, ungepaarte *Mann-Whitney-Test* zum Einsatz. Das Konfidenzintervall (*confidence interval*, CI) betrug dabei 95 %. Statistische Signifikanz wurde im Rahmen der Auswertung durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$ und *n.s.* für nicht signifikante Ergebnisse gekennzeichnet. In den Grafiken wurden die Mittelwerte \pm dazugehöriger Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt.

4.2.7.2 Statistische Auswertung der Dendritenbaumanalyse der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex

Es wurde die durch die *Imaris8.0*-Software durchgeführte Analyse nach Sholl (Sholl 1953) von WT und Abp1-KO mit einem Abstand der konzentrischen Ringe von 5 μm für Schicht II/III und Schicht V mithilfe einer Varianzanalyse mit Messwiederholungen (*analysis of variance*, ANOVA) als *Two-Way*-ANOVA mit Bonferroni-Posttest (mit CI = 95 %) ausgewertet, um die durchschnittliche Anzahl der Schnittpunkte der Dendritenbäume der Pyramidenzellen des WT und Abp1-KO für jeden aufeinander folgenden Ring mit steigendem Radius auf eine signifikante Differenz hin überprüfen zu können. Diese Auswertung ermöglichte für jeden aufgetragenen Radius den direkten Vergleich der durchschnittlichen Anzahl der Schnittpunkte pro Ring zwischen WT und Abp1-KO. Eine Auswertung mittels *Two-Way*-ANOVA mit Bonferroni-Posttest (mit CI = 95 %) wurde ebenfalls hinsichtlich der Häufigkeiten der Verzweigungslevel 1 bis 10 angewandt, um auch hier für jedes Level WT und Abp1-KO direkt vergleichen zu können.

Bezüglich der Zahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle, der Länge des Dendritenbaumes der Zelle, der mittleren Segmentlänge pro Zelle, der mittleren Anzahl der Segmente pro Zelle, des Gesamtvolumens des Dendritenbaumes der Zelle und des mittleren Verzweigungswinkels pro Zelle wurden die Werte aus WT und Abp1-KO anhand des *D'Agostino-&-Pearson* Tests auf Normalverteilung überprüft und entsprechend mittels zweiseitigem, ungepaarten *student's t*-Test oder zweiseitigem, ungepaarten *Mann-Whitney*-Test (mit CI = 95 %) auf Signifikanz geprüft. Statistische Signifikanz wurde im Rahmen der Auswertung durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$ und *n.s.* für nicht signifikante Ergebnisse gekennzeichnet. In den Grafiken wurden die Mittelwerte \pm dazugehöriger SEMs dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Abp1 beeinflusst die Ausbildung dendritischer Dornen in der CA1 Region des Hippocampus

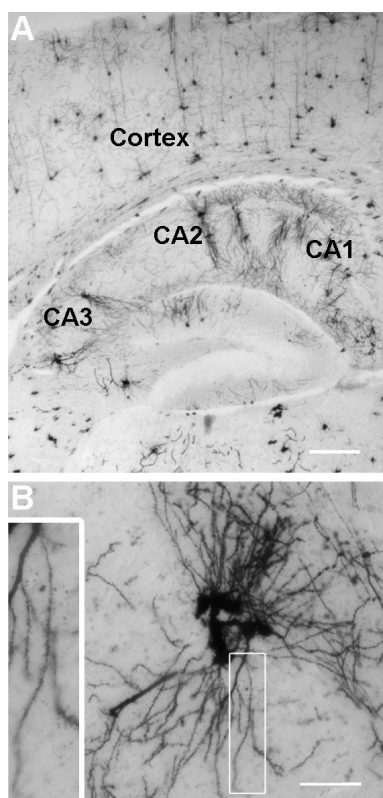


Abbildung 10 Golgi-gefärbte Aufnahmen des Hippocampus

A Golgi-gefärbter sagittaler Schnitt durch den Hippocampus einer adulten, 25 Wochen alten Maus. Im Focus des Bildes ist die CA Region zu sehen, das in mehrere Subregionen untergliedert ist (CA4 Region nicht dargestellt), wobei die CA1 Region den größten Teil einnimmt. Balken 300 μm .

B Ausschnitt der CA1 Region des Hippocampus mit dornbesetzten Pyramidenzellen. Die Vergrößerung zeigt einen mit Dornfortsätzen besetzten, sekundären Dendriten. Balken 50 μm .

Die CA1 Region des murinen Hippocampus (Abbildung 10; A) besteht aus fünf bis acht übereinander liegenden Schichten an Pyramidenzellen und ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung neuronaler Strukturen (Amaral und Lavenex 2007).

Um Auswirkungen der Abp1-Defizienz auf die Expression des Proteins im Hippocampus der Abp1-KO-Mäuse nach Qualmann et al. (2004) zu überprüfen, wurden Übersichtsaufnahmen des Hippocampus Immunfluoreszenz-gefärbter 55 μm dicker, coronarer Gehirnschnitte von Abp1-KO-Mäusen mit Gehirnschnitten des WT verglichen.

Um weiter die Ausbildung von Dornfortsätzen *in vivo* zu adressieren, wurden 40 μm dicke, sagittale Gehirnschnitte von jeweils drei adulten 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen angefertigt und mittels FD Rapid GolgiStain™ Kit gefärbt. Am Durchlichtmikroskop wurden diese Schnitte nachfolgend mikroskopiert und dornbesetzte Dendriten von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus (Abbildung 10; B) in durchschnittlich 50 z-Stacks aufgenommen.

Für die Analyse der Dornfortsätze in 3D-Rekonstruktion wurden ausschließlich Dendriten sekundärer oder höherer Ordnung ausgewählt. Im Rahmen der Untersuchung wurde der Schwerpunkt auf die Auswertung der Anzahl an Dornfortsätzen pro Dendrit sowie die Verteilung der einzelnen Dornfortsatzklassen und die Kopfweite der Dornfortsätze und das Kopfvolumen der Dornfortsätze sowie die Dornfortsatzlänge gelegt.

5.1.1 In Gehirnschnitten von Abp1-KO-Mäusen zeigt sich in der Immunfluoreszenz ein deutlich reduziertes Signal des anti-mAbp1-Antikörpers im Hippocampus

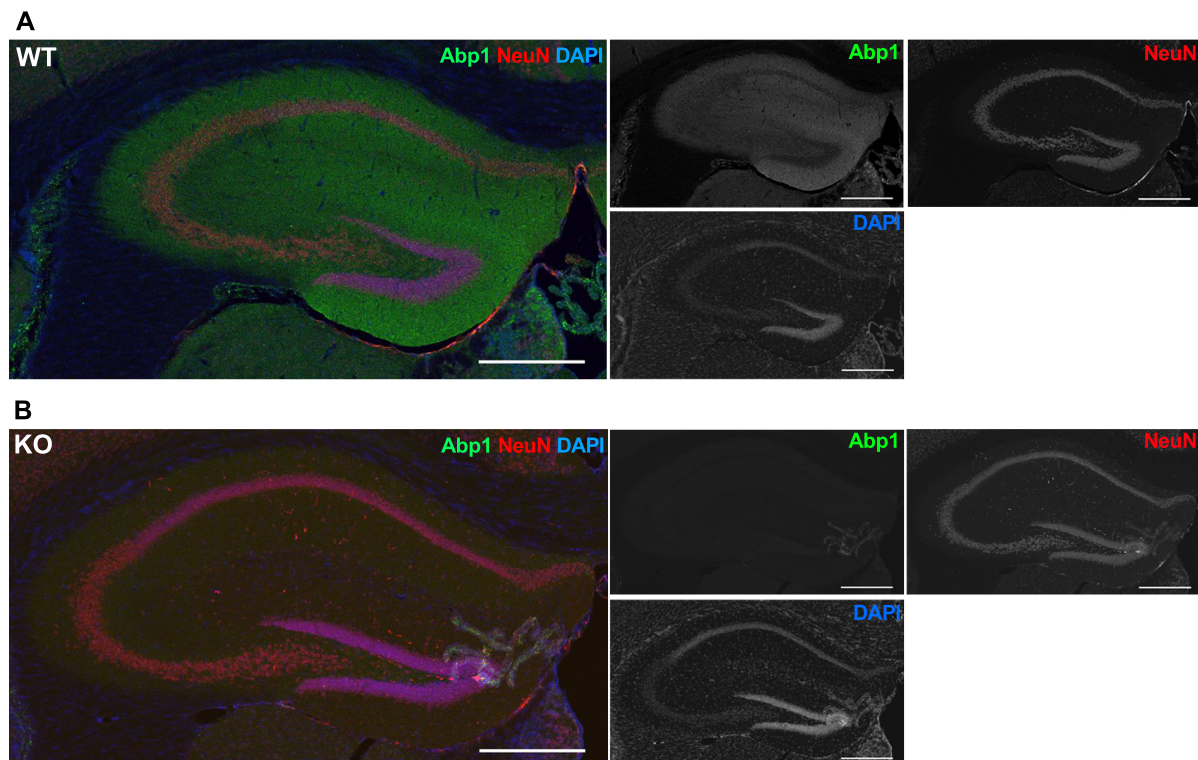


Abbildung 11 Vergleich der Expression von Abp1 im Hippocampus von WT- und Abp1-KO-Maus mittels Immunfluoreszenzfärbung Die Immunfluoreszenzfärbung von 55 μm dicken, coronaren Kryoschnitten des Gehirns einer WT- (**A**) und Abp1-KO-Maus (**B**) zeigt im Hippocampus des Abp1-KO ein deutlich reduziertes Abp1-Signal verglichen mit dem WT. Verwendet wurden anti-mAbp1-Antikörper (*grün*), der Neuronenmarker anti-NeuN (*rot*) und der DNA-bindende Farbstoff DAPI (*blau*). Balken 200 μm .

Zunächst sollte die Expression von Abp1 im Gehirn und vor allem in den zu analysierenden Hirnregionen mittels Immunfluoreszenzfärbung im WT nach Qualmann et al. (2004) reproduziert und mit dem Abp1-KO verglichen werden. Es wurden 55 μm dicke, coronare Kryoschnitte des Gehirns einer WT- und einer Abp1-KO-Maus unter Verwendung des anti-mAbp1-Antikörpers (*grün*), des Neuronenmarkers anti-NeuN (*rot*) und des DANN-bindenden Farbstoffs DAPI (*blau*) angefärbt und verglichen (Abbildung 11). Die Immunfluoreszenzfärbung des Hippocampus zeigte im WT ein deutliches Signal des anti-mAbp1-Antikörpers im gesamten Hippocampus inklusive der untersuchten CA1 Region (Abbildung 11; A). Im Abp1-KO ist das Signal im Hippocampus abgeschwächt. Die Darstellung der Einzelkanäle zeigte im Vergleich mit dem WT im Abp1-KO kein deutliches Signal des anti-mAbp1-Antikörpers (Abbildung 11; B).

5.1.2 Abp1-KO-Mäuse zeigen verringerte Dornfortsatzdichten in der CA1 Region des Hippocampus

Betrachtet wurde zuerst die Gesamtdornfortsatzdichte pro 10 μm Dendrit sowie die Dichte der verschiedenen Morphologieklassen der Dornfortsätze, klassifiziert mithilfe des integrierten *MATLAB*-Moduls. Die Parameter des *MATLAB*-Moduls sind dem Methodenteil (Kapitel 4.2.6.1) zu entnehmen. Prozentuale Abweichungen der verglichenen Mittelwerte aller Parameter in WT und Abp1-KO sind im Anhang (Kapitel 9.1.1) dargestellt.

In der *Imaris8.0*-Software wurde der manuell markierte, analysierte Abschnitt eines Neurons als Filament bezeichnet. Die Filamentlängen der analysierten Dendritenabschnitte bewegten sich in WT und Abp1-KO zwischen 56,82 μm und 114,80 μm .

Die Gesamtdornfortsatzdichte zeigte im Abp1-KO im Vergleich zum WT eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) um etwa 32 % (Abbildung 20 im Anhang; A) von $10,98 \pm 0,27$ auf $7,42 \pm 0,18$ Dornfortsätze pro 10 μm Filament (Abbildung 12; A-E). Für jede der Morphologieklassen zeigte sich außer für die stummelförmigen Dornen eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) der Dornfortsatzdichte (Abbildung 12; F-I). Am stärksten war die Reduktion mit knapp 45 % (Abbildung 20 im Anhang; F) von $1,81 \pm 0,10$ zu $0,99 \pm 0,06$ in der Klasse der filopodienähnlichen Dornfortsätze, die als Vorläufer neuer dendritischer Dornfortsätze diskutiert werden (Hering und Sheng 2001, Hoogenraad und Akhmanova 2010, Papa et al. 1995, Yuste und Bonhoeffer 2001, Ziv und Smith 1996, Yuste 2010). Die Dichte der pilzförmigen Dornfortsätze nahm von $5,45 \pm 0,17$ auf $3,51 \pm 0,10$ um etwa 35 % (Abbildung 20 im Anhang; C) ab. Eine Reduktion um ein Viertel (Abbildung 20 im Anhang; D) von $2,47 \pm 0,12$ auf $1,82 \pm 0,07$ zeigte die Dichte der dünnen Dornfortsätze. Diese drei Klassen wiesen ähnlich starke und signifikante prozentuale Abnahmen auf. Die Abnahme der Dichte der stummelförmigen Dornfortsätze im Abp1-KO war nicht signifikant.

Es zeigten sich unterschiedlich signifikante Veränderungen der relativen Häufigkeiten der stummelförmigen und filopodienähnlichen Dornfortsätzen, während der größte prozentuale Anteil sowohl in WT als auch Abp1-KO mit annähernd 50 % bei den reifen, pilzförmigen Dornfortsätzen lag und wie der Anteil der dünnen Dornen unverändert blieb (Abbildung 12; J). Im WT schlossen sich zuerst die dünnen (23 %), dann die filopodienähnlichen (16 %) Dornfortsätze an. Den geringsten Anteil stellten die stummelförmigen Dornen mit etwa 11 %. Gegensätzlicher Weise wurden die

pilzförmigen Dornen im Abp1-KO zwar auch von den dünnen Dornfortsätzen (24 %), dann jedoch von den stummelförmigen (15 %) und darauf von den filopodienähnlichen (13 %) Dornfortsätzen gefolgt.

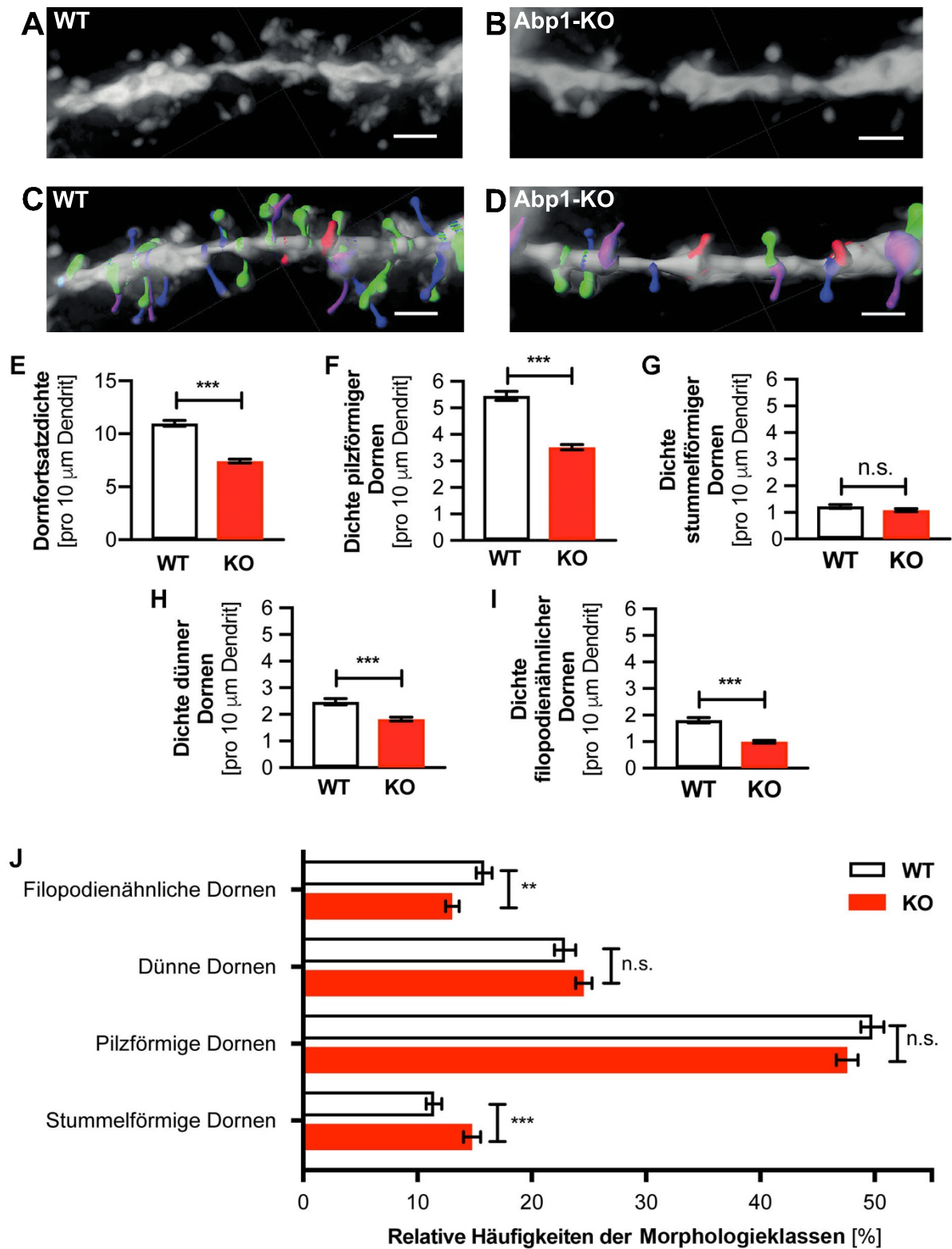


Abbildung 12 Vergleich der Dornfortsatzdichten sowie Dichten einzelner Morphologieklassen von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen

A,B Ausschnitte sekundärer hippocampaler Dendriten einer 25 Wochen alten WT- (**A**) und Abp1-KO-Maus (**B**). Mehrere z-Stapel der nach Golgi-gefärbten Dendriten sind durch die *Imaris8.0*-Software 3D rekonstruiert und der Hintergrund größtenteils hinausgerechnet. Balken 2 μm .

C,D 3D-Rekonstruktion des manuell markierten Dendritenabschnitts von WT (**C**) und Abp1-KO (**D**). Die Dornfortsätze sind mithilfe des *MATLAB*-Moduls klassifiziert und farblich unterschiedlich dargestellt. Rot entspricht stummelförmigen, Grün pilzförmigen, Blau dünnen und Magenta filopodienähnlichen Dornen. Balken 2 μm

E-I Analysiert wurden die gesamte Dornfortsatzdichte (**E**), die Dichte stummelförmiger Dornen (**F**), pilzförmiger Dornen (**G**), dünner Dornen (**H**) sowie filopodienähnlicher Dornen (**I**) an Dendriten von Pyramidenzellen der CA1 Region in jeweils drei WT und drei Abp1-KO-Mäusen. Untersucht wurden insgesamt 91 Dendriten im WT und insgesamt 90 Dendriten im Abp1-KO. Alle Parameter wurden auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz zwischen WT und Abp1-KO anhand des ungepaarten, zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test (CI=95%) untersucht.

J Vergleich der relativen Häufigkeiten der einzelnen Morphologieklassen in WT und Abp1-KO. Die relativen Häufigkeiten wurden mittels ungepaarten, zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test (CI=95%) analysiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveaus entsprechen ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$ und n.s. für nicht signifikante Ergebnisse.

5.1.3 Dornfortsätze hippocampaler Dendriten zeigen morphologische Auffälligkeiten im Abp1-KO

Nachfolgend wurden die morphologischen Parameter Kopfweite, Kopfvolumen und Dornfortsatzlänge der detektierten Dornfortsätze von WT und Abp1-KO verglichen, um mögliche strukturelle Veränderungen aufgrund einer Abp1- Defizienz aufzeigen zu können.

Für den Vergleich der Kopfweiten und des Kopfvolumens wurden die filopodienähnlichen Dornen nicht ausgewertet, da diese nicht die typische Kopfform eines Dornfortsatzes besitzen (Fiala et al. 1998). Quantifiziert wurden die Kopfweiten und das Kopfvolumen in allen anderen Morphologieklassen in WT und Abp1-KO.

Insgesamt wurde die Morphologie von 8396 Dornfortsätzen im WT und 5982 Dornfortsätzen im Abp1-KO ausgewertet. Für die einzelnen Morphologieklassen ergaben sich n-Zahlen zwischen 945 und 4169 im WT und zwischen 790 und 2823 im Abp1-KO.

Der Vergleich der Kopfweiten in der Klasse der pilzförmigen Dornfortsätze zeigte eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) von $0,599 \pm 0,002 \mu\text{m}$ auf $0,575 \pm 0,003 \mu\text{m}$ (Abbildung 13; B), was einer Reduktion von etwa vier Prozent entsprach (Abbildung 21 im Anhang; B). In der Klasse der stummelförmigen und der dünnen Dornen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis (Abbildung 13; A, C). Es wurde zur genaueren Untersuchung des phänotypischen Unterschieds der Kopfform der pilzförmigen Dornen zusätzlich das Kopfvolumen der stummelförmigen, pilzförmigen und dünnen

Dornen in WT und Abp1-KO untersucht (Abbildung 13; D-F). Auch hier fand sich analog zur Kopfweite in der Klasse der pilzförmigen Dornen eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) um etwa vier Prozent (Abbildung 21 im Anhang; E) von $0,163 \pm 0,002 \mu\text{m}^3$ auf $0,156 \pm 0,002 \mu\text{m}^3$ im Abp1-KO. Das Kopfvolumen der stummelförmigen Dornen war nicht signifikant verändert, während in der Klasse der dünnen Dornen eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) des Kopfvolumens von $0,150 \pm 0,003 \mu\text{m}^3$ auf $0,117 \pm 0,003 \mu\text{m}^3$ zu beobachten war; dies entspricht einer Reduktion von etwa 22 % (Abbildung 21 im Anhang; F).

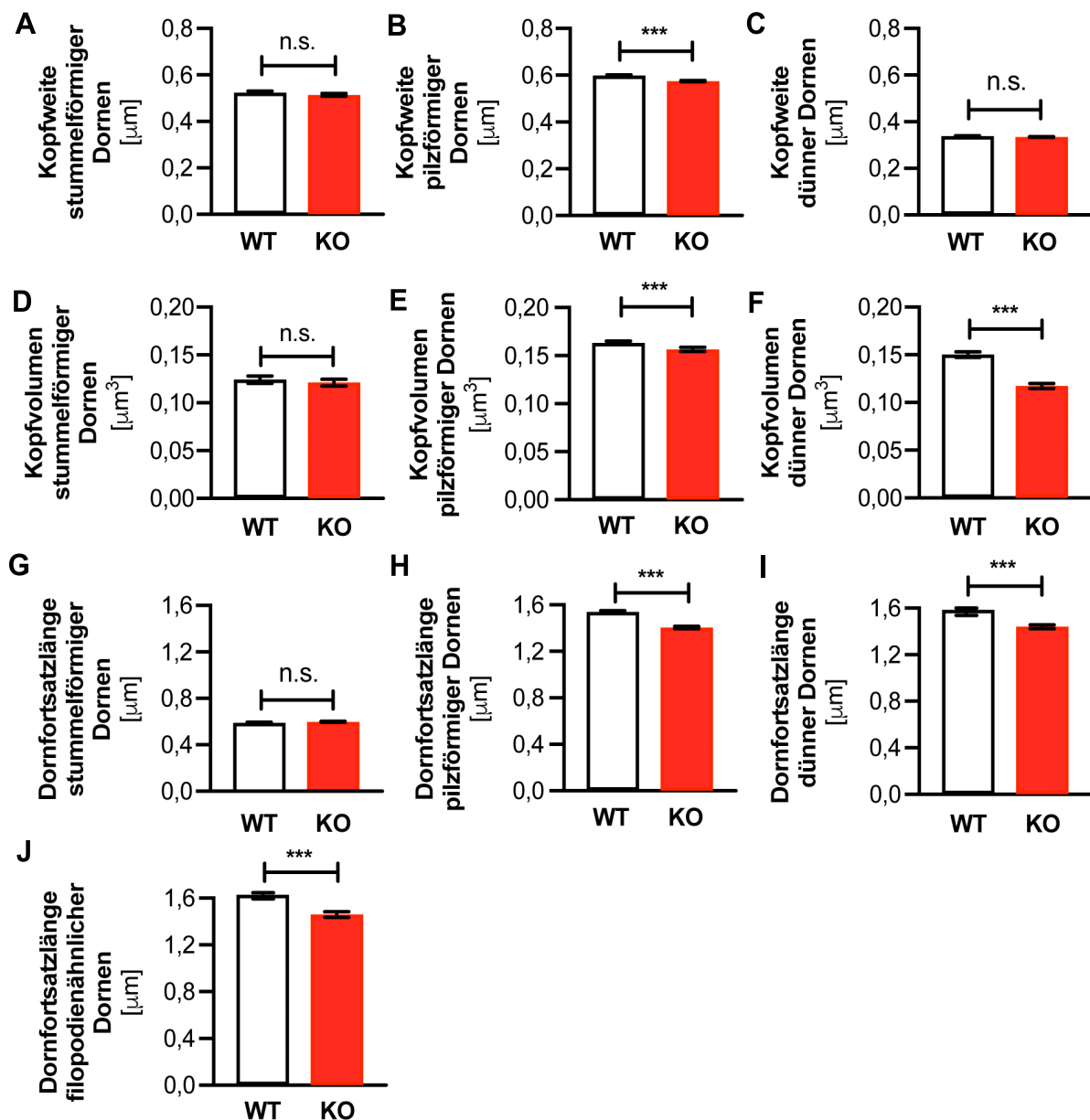


Abbildung 13 Vergleich spezifischer morphologischer Parameter der Dornfortsätze der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen

Analysiert wurden die Dornfortsätze aller Klassen an Dendriten von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus von in jeweils drei 25-Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen.

Untersucht wurden insgesamt 91 Dendriten im WT und insgesamt 90 Dendriten im Abp1-KO. Alle Parameter wurden auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz zwischen WT und Abp1-KO anhand des ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney (CI=95%) untersucht.

A-C Kopfweite stummelförmiger (WT n=945; KO n=882), pilzförmiger (WT n=4169; KO n=2823) und dünner (WT n=1846; KO n=1487) Dornen.

D-F Kopfvolumen stummelförmiger (WT n=945; KO n=882), pilzförmiger Dornen (WT n=4169; KO n=2823) und dünner (WT n=1846; KO n=1487) Dornen.

G-J Dornfortsatzlänge stummelförmiger (WT n=945; KO n=882), pilzförmiger (WT n=4169; KO n=2823), dünner (WT n=1846; KO n=1487) und filopodienähnlicher (WT n=1436; KO n=790) Dornen.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der GraphPad Prism 7.0-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte aller Einzelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveau entspricht *** für $p < 0,001$; n.s. für nicht signifikante Ergebnisse.

In allen vier Morphologieklassen wurde schließlich die Dornfortsatzlänge ausgewertet (Abbildung 13; G-J). Es fiel auf, dass alle Klassen bis auf die der Stummelförmigen annähernd ähnliche, signifikante Reduktionen ($p < 0,001$) aufweisen. Die Länge der pilzförmigen Dornfortsätze nahm um etwa 9 % (Abbildung 21 im Anhang; H) von $1,539 \pm 0,010 \mu\text{m}$ auf $1,405 \pm 0,010 \mu\text{m}$, die der dünnen Dornen ebenfalls um etwa 9 % (Abbildung 21 im Anhang; I) von $1,587 \pm 0,151 \mu\text{m}$ auf $1,440 \pm 0,157 \mu\text{m}$ und die der filopodienähnlichen Dornen um etwa 10 % (Abbildung 21 im Anhang; J) von $1,614 \pm 0,171 \mu\text{m}$ auf $1,461 \pm 0,023 \mu\text{m}$ ab.

Fasst man die obigen Ergebnisse zusammen, so zeigte sich im Abp1-KO ein Phänotyp mit generell verringerter Dornfortsatzdichte. Bis auf die stummelförmigen Dornen waren die Dornfortsätze der Dendriten der Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus des Abp1-KO verkürzt. Besonders die pilzförmigen und dünnen Dornfortsätze fielen zusätzlich durch eine verringertes Kopfvolumen des Dornfortsatzes und die pilzförmigen Dornen ebenfalls durch einen verringerten Kopfdurchmesser im Vergleich zum WT auf und schienen morphologisch verändert zu sein.

5.2 Abp1-KO Mäuse zeigen morphologisch veränderte Dendritenbäume im Sensorischen Cortex

Um Auswirkungen der Abp1-Defizienz auf die Expression von Abp1 in den Dendriten der Pyramidenzellen der untersuchten Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex der Abp1-KO-Maus *in situ* zu überprüfen, wurden Übersichtsaufnahmen des Sensorischen Cortex Immunfluoreszenz-gefärbter 55 µm dicker, coronarer Gehirnschnitte von Abp1-KO-Mäusen mit Gehirnschnitten des WT verglichen.

Des Weiteren wurden murine Cortexneurone (DIV6) mittels Immunfluoreszenz angefärbt, um das Vorkommen von Abp1 in Wachstumskegeln muriner Neurone während der Dendritogenese zu untersuchen.

Die Komplexität der Dendritenbäume von Pyramidenzellen der Schicht II/III und Schicht V des Sensorischen Cortex wurde anhand morphologischer Korrelate untersucht. Die Untersuchung folgte einer speziellen Terminologie (Kapitel 4.2.6.2). Es wurde an nach Golgi-gefärbten 40 µm dicken, sagittalen Gehirnschnitten 25-Wochen alter Mäuse eine Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen nach Sholl (Sholl 1953), eine Untersuchung der Häufigkeiten der Verzweigungslevel eins bis zehn, ein Vergleich der dendritischen Verzweigungspunkte, der Längen der Dendritenbäume, der mittleren Segmentlängen, der mittleren Anzahlen der Segmente, der Gesamtvolumina der Dendritenbäume sowie der mittleren Verzweigungswinkel pro Zelle durchgeführt. Aufgrund seiner Größe und der guten Abgrenzbarkeit während der Mikroskopie wurden ausschließlich Pyramidenzellen des Sensorischen Cortex ausgewählt, hinsichtlich der Qualität der Golgi-Färbung selektiert und untersucht.

5.2.1 In Gehirnschnitten von Abp1-KO-Mäusen zeigt sich in der Immunfluoreszenz ein geringeres Signal des anti-mAbp1-Antikörpers im Sensorischen Cortex

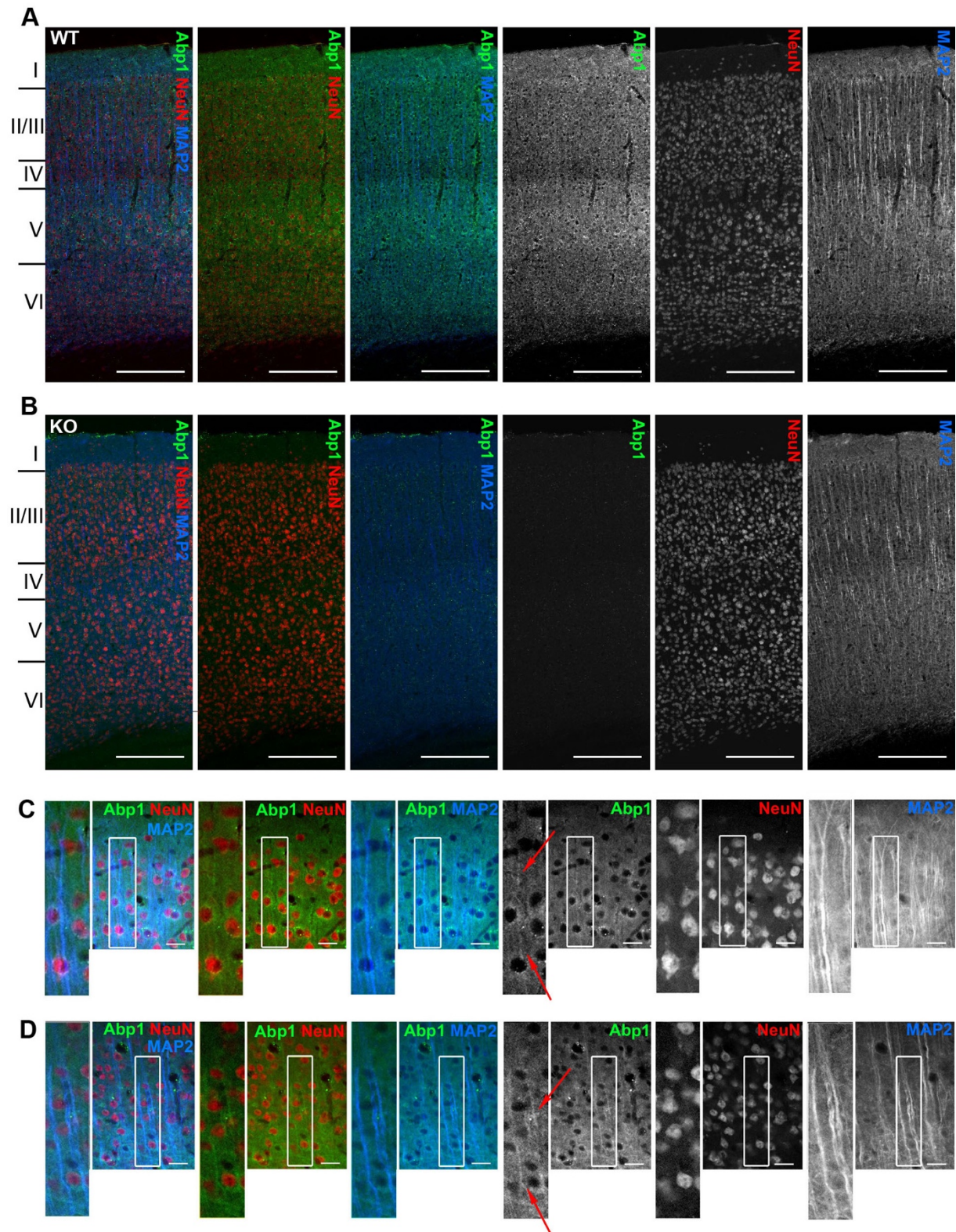


Abbildung 14 Darstellung und Vergleich der Expression von Abp1 im Sensorischen Cortex von WT- und Abp1-KO-Maus mittels Immunfluoreszenzfärbung

A,B Die Immunfluoreszenzfärbung von 55 µm dicken, coronaren Kryoschnitten des Gehirns einer WT- (A) und Abp1-KO-Maus (B) aufgenommen in z-Stacks in 10-facher Vergrößerung zeigt im Sensorischen Cortex des Abp1-KO ein deutlich reduziertes Signal im gesamten Cortex verglichen

mit dem WT. Verwendet wurden der anti-Abp1-Antikörper (*grün*), der Neuronenmarker anti-NeuN (*rot*) und der Dendritenmarker anti-MAP2 (*blau*). Balken 200 μm .

C,D Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-gefärbten 55 μm dicken, coronaren Kryoschnitte des Gehirns einer WT-Maus auf Einzelzelebene in 40-facher Vergrößerung zeigen auf Höhe der Schichten II/III (**C**) und V (**D**) eine Lokalisation des anti-mAbp1-Antikörper-Signals (*grün*) in den durch den Dendritenmarker anti-MAP2 (*blau*) markierte Abschnitten der Dendriten der Pyramidenzellen. Balken 20 μm .

Es wurde die Expression von Abp1 im Sensorischen Cortex des WT mittels Immunfluoreszenzfärbung nach Qualmann et al. (2004) reproduziert und mit dem Abp1-KO verglichen. Die Differenzierung der einzelnen Schichten erfolgte hier ohne Schichtenmarker manuell durch Abschätzung der Anreicherung der Zellkerne. Der Vergleich der Sensorischen Cortices von WT und Abp1-KO-Maus zeigte in der Darstellung der Einzelkanäle ein Signal des anti-mAbp1-Antikörpers (*grün*) in Schicht II/III und besonders Schicht V des Sensorischen Cortex des WT (Abbildung 14; A), während das Signal im Cortex des Abp1-KO ubiquitär deutlich reduziert war (Abbildung 14; B). Die Mikroskopie der Schichten II/III (Abbildung 14; C) und V (Abbildung 14; D) des WT in 40-facher Vergrößerung bestätigte auf Einzelzelebene die Lokalisation eines verstärkten anti-mAbp1-Antikörper-Signals (*grün*) in den durch den Dendritenmarker anti-MAP2 (*blau*) markierten Dendriten dieser Schichten. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Abp1 in WT-Mäusen in den Dendritenbäumen der Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex, die anschließend untersucht wurden, exprimiert wird.

5.2.2 In jungen murinen Cortexneuronen ist Abp1 in Wachstumskegeln angereichert

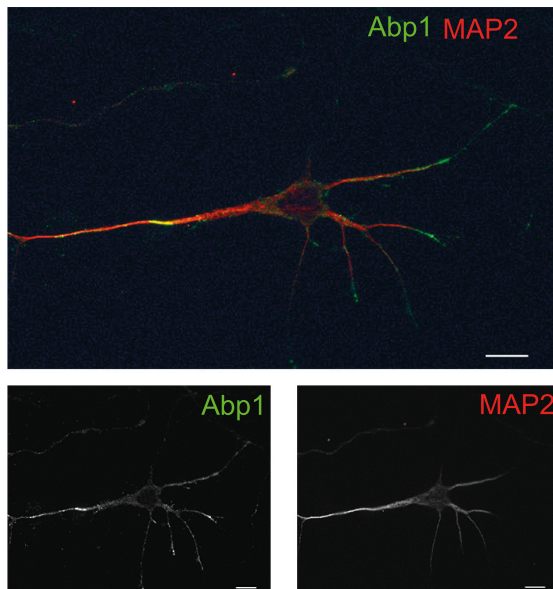


Abbildung 15 Lokalisation von Abp1 in Wachstumskegeln während der Dendritogenese junger muriner Cortexneurone (DIV6) Bei gleichzeitiger Färbung mit dem Dendritenmarker anti-MAP2 (rot) während der Dendritogenese, wird eine Anreicherung von Abp1 (grün) vor allem in den distalen Wachstumskegeln deutlich. Balken 10 µm.

In Anlehnung an Untersuchungen an jungen, hippocampalen Rattenneuronen, in denen die Lokalisation von Abp1 in Wachstumskegeln bereits nachgewiesen wurde (Fenster et al. 2003), konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung auch in murinen Cortexneuronen (DIV6) eine Anreicherung von Abp1 in den Wachstumskegeln nachgewiesen werden (Abbildung 15). So zeigten die Dendriten der jungen murinen Cortexneurone, die zu diesem Zeitpunkt noch wenig Verzweigungen aufwiesen, eine vermehrte Expression von Abp1 (grün) am distalen Ende der basalen Dendriten. Diese Beobachtungen ließen auf ein Vorkommen von Abp1 in Regionen des

Zellwachstums der murinen Cortexneurone schließen. Es ließ sich vermuten, dass das Protein hier eine besondere Rolle in den Wachstumskegeln der Dendriten spielen könnte.

Um Auswirkungen einer Abp1-Defizienz auf die Morphologie muriner Cortexneurone *in vivo* untersuchen zu können, wurden anschließend Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex 25-Wochen Abp1-KO-Mäuse analysiert und mit dem WT verglichen.

5.2.3 Abp1-KO Mäuse besitzen eine reduzierte Komplexität des Dendritenbaumes in Schicht II/III des Sensorischen Cortex

Die Analyse der Dendritenbäume in der intercortical Assoziationsfasern prozessierenden (Leone et al. 2008, Welsch und Deller 2010) Schicht II/III nach Sholl, zeigte eine deutliche Abweichung des Abp1-KO vom WT bei Analyse der Schnittpunkte des Dendritenbaumes mit der Projektion konzentrischer Ringe im Abstand von 10 μm bis zu einer maximalen Distanz von 100 μm vom Startpunkt im Zellsoma.

Die Zellen des Abp1-KO wiesen bei Abständen zwischen 10 μm und 60 μm signifikant weniger Schnittstellen der Dendriten mit den projizierten Ringen als die Dendriten des WT auf (Abbildung 16). Bei einem Radius von 10 μm zeigte die Anzahl der

dendritischen Schnittpunkte die geringste Signifikanz ($p < 0,05$), während im Bereich zwischen 20 μm und 55 μm hohe Signifikanz ($p < 0,001$) herrschte. Der maximale Wert der dendritischen Schnittpunkte lag im WT bei $7,32 \pm 0,25$ pro Ring bei einem Radius von 30 μm vom Startpunkt im Zellsoma. Im Abp1-KO fand sich das Maximum mit einem Wert von $5,49 \pm 0,24$ Schnittpunkten bereits bei einem Radius von 25 μm . Die größte Differenz der Mittelwerte von WT und Abp1-KO trat bei einem Radius von 30 μm auf und beträgt hier 1,89 dendritische Schnittpunkte; dies entsprach etwa 25 %. Ab etwa einem Radius von 70 μm begannen die beiden Graphen, sich anzupassen, und ab etwa 90 μm liefen sie bis zum Ende der Auswertung parallel mit nur noch geringfügig höheren Werten im WT. Detaillierte Werte der dendritischen Schnittpunkte aller Radii (Abstände vom Zellsoma) finden sich im Anhang (Tabelle 10 im Anhang).

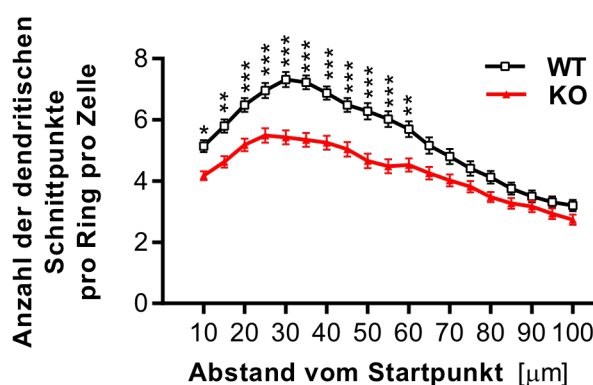


Abbildung 16 Analyse von Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO-Mäusen nach Sholl

Die Grafik zeigt die Analyse von Dendritenbäumen nach Golgi-gefärbter Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex nach Sholl bei einem Abstand der Ringe von 5 μm . Analysiert wurden 92 Zellen von jeweils drei 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen. Mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software wurden die Werte beider Genotypen für jeden Radius (Abstand vom Startpunkt) aufgetragen und mithilfe einer *Two-Way-ANOVA* mit Bonferroni-Posttest ($CI=95\%$) ausgewertet. In der Grafik sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Detaillierte Werte der Schnittpunkte aller Abstände vom Zellsoma finden sich im Anhang (Tabelle 10 im Anhang). Signifikanzniveaus entsprechen * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Ein Phänotyp mit reduzierter Komplexität der Dendritenbäume der Pyramidenzellen des Sensorischen Cortex im Abp1-KO, wie ihn die Ergebnisse der Analyse nach Sholl darstellen, wurde auch durch die Analyse der Verzweigungslevel in WT und Abp1-KO (Abbildung 17, A) bestätigt. Detaillierte Werte aller Verzweigungslevel sind in Tabelle 11 des Anhangs aufgeführt. Die Untersuchung zeigte bei gleicher n-Zahl betrachteter Zellen im Abp1-KO eine signifikant reduzierte Anzahl an Segmenten des ersten, zweiten sowie dritten Verzweigungslevels der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex. Pyramidenzellen der Schicht II/III des WT besaßen im Mittel $11,19 \pm 0,36$ Segmente ersten Verzweigungslevels, die nach den Vorgaben der *Imaris8.0*-Software direkt vom Zellsoma abgingen. Die Pyramidenzellen des Abp1-KO entgegen besaßen auf Höhe des ersten Verzweigungslevels im Mittel nur $8,76 \pm 0,32$ Segmente; dies entsprach einer Abnahme von ungefähr 25 %. Die Werte dieses Parameters verliefen nicht parallel, näherten sich jedoch im Verlauf der Analyse an, sodass die Anzahl der Verzweigungslevel ab dem sechsten Verzweigungslevel in beiden Genotypen 0 entsprach. Unterstützt wurden die Beobachtungen durch den Vergleich der Gesamtzahl aller dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle in WT und Abp1-KO (Abbildung 17; B). Eine verringerte Komplexität des Dendritenbaumes der Schicht-II/III-Pyramidenzellen im Abp1-KO wurde mithilfe des zweiseitigen *Mann-Whitney*-Tests durch eine stark signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der dendritischen Verzweigungspunkte von $11,74 \pm 0,57$ pro Zelle auf $7,71 \pm 0,33$ pro Zelle um etwa 34 % (Abbildung 22 im Anhang; A) unterstrichen.

Des Weiteren wurden die Gesamtlänge des Dendritenbaumes, die mittlere Segmentlänge sowie die Anzahl der Segmente pro Zelle, das Gesamtvolumen des Dendritenbaumes und der mittlere Verzweigungswinkel pro Zelle erhoben, um mögliche Kompensationsmechanismen der verringerten Verzweigung der Dendriten im Abp1-KO zu untersuchen (Abbildung 17; C-G). Interessanterweise zeigten die Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex des Abp1-KO Tiere jedoch keine Verlängerung des Dendritenbaumes, sondern im Vergleich mithilfe des zweiseitigen *Mann-Whitney*-Tests eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) der Länge des Dendritenbaumes von $916 \pm 26 \mu\text{m}$ auf $741 \pm 24 \mu\text{m}$ um etwa 19 % verglichen mit dem WT (Abbildung 22 im Anhang; B). Analog wurden die mittleren Segmentlängen sowie die mittlere Anzahl der Segmente beider Genotypen verglichen, um zu untersuchen, ob die verringerte Länge des Dendritenbaumes mit einer Reduktion der mittleren Segmentlänge der Zelle oder der mittleren Segmentanzahl der Zelle assoziiert ist. Es

zeigte sich mittels *student's t-test* jedoch eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der mittleren Segmentlänge um etwa 15 % (Abbildung 22 im Anhang; C) von $34,33 \pm 0,86 \mu\text{m}$ auf $39,53 \pm 1,08 \mu\text{m}$. Gleichzeitig ergab sich in der Auswertung mittels des zweiseitigen *Mann-Whitney-Tests* eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) der Anzahl der Segmente pro Zelle bei den Pyramidenzellen des Abp1-KO um etwa 30 % (Abbildung 22 im Anhang; D) von $28,07 \pm 1,15$ Segmenten pro Zelle auf $19,65 \pm 0,69$ Segmente pro Zelle. Der Vergleich der Volumina der Dendritenbäume beider Genotypen mithilfe des *Mann-Whitney-Tests* ergab eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) des Volumens der Dendritenbäume der Pyramidenzellen des Abp1-KO in Schicht II/III des Sensorischen Cortex. Die Reduktion beträgt etwa 25 % (Abbildung 22 im Anhang; E) entsprechend einer Abnahme von $10996 \pm 998 \mu\text{m}^3$ auf $8249 \pm 855 \mu\text{m}^3$.

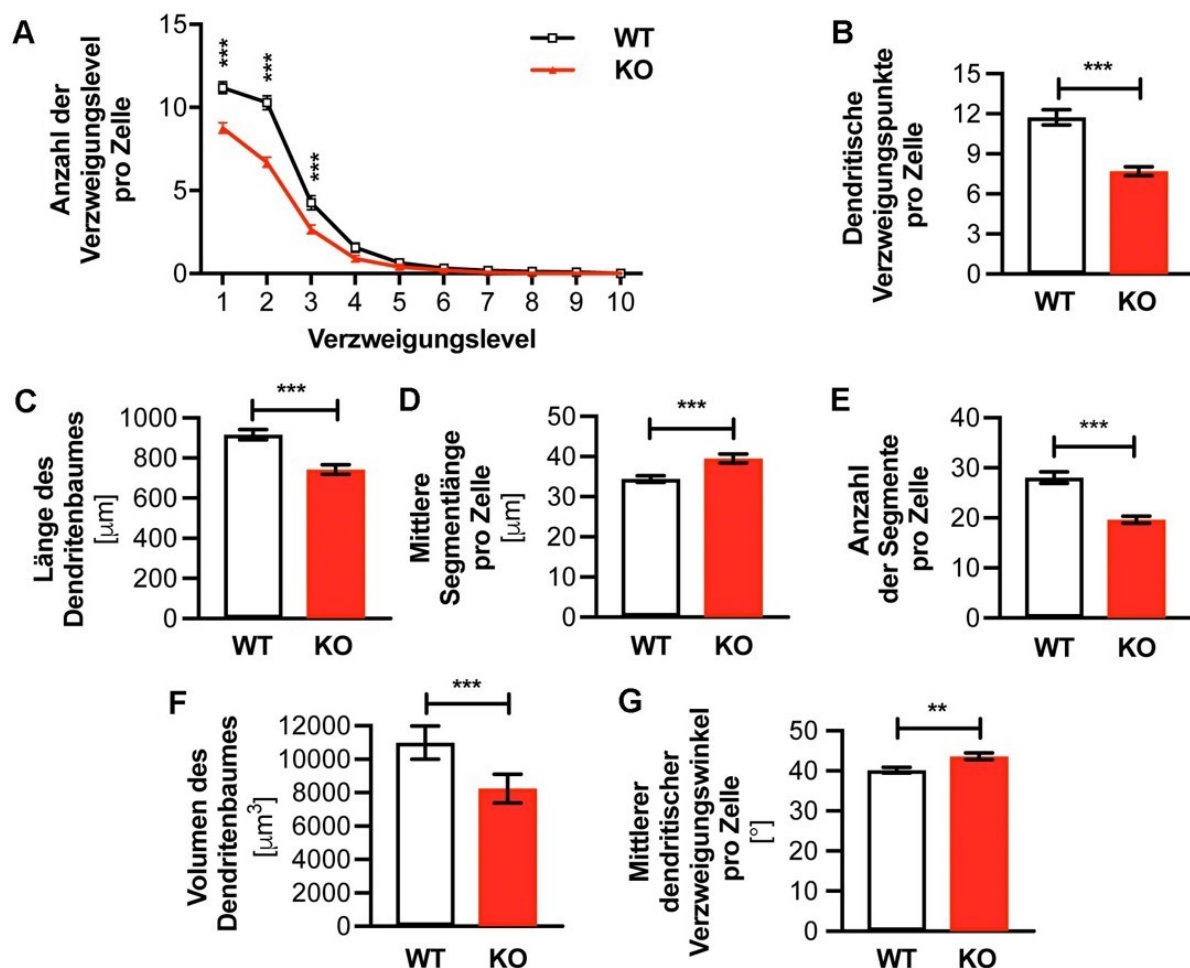


Abbildung 17 Vergleich verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht II/III des Sensorischen Cortex WT und Abp1-KO-Mäusen A Gezeigt ist die Analyse der Verzweigungslevel der Dendritenbäume von Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex in jeweils drei 25 Wochen alten WT (n=92) und Abp1-KO-Mäusen (n=92). Durch die *GraphPad Prism 7.0*-Software wurden die Mittelwerte der Einzelwerte beider Genotypen für jedes Verzweigungslevel einzeln aufgetragen und mithilfe einer *Two-Way-ANOVA* mit Bonferroni-Posttest (CI=95%) ausgewertet. Detaillierte Mittelwerte ± SEM der einzelnen Verzweigungslevel beider Genotypen finden sich im Anhang (Tabelle 11 im Anhang).

B-G Gezeigt ist der Vergleich der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle (**B**), der Länge der Dendritenbäume (**C**), der Anzahl der Segmente pro Zelle (**E**), der Gesamtvolumina der Dendritenbäume (**F**) sowie des mittleren Verzweigungswinkels pro Zelle (**G**) mittels zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test und der Vergleich der mittleren Segmentlänge pro Zelle (**D**) mittels *student's t-test*. Ausgewertet wurden die Dendritenbäume von Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex in WT (n=92) und Abp1-KO-Mäusen (n=92).

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte aller Einzelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveaus entsprechen ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Zusätzlich wurde auch der mittlere dendritische Verzweigungswinkel pro Zelle erhoben, für den alle Winkel des Dendritenbaumes einer Zelle gemittelt wurden und so ein mittlerer Winkel pro Filament errechnet wurde. Hierbei war in der Auswertung mittels des zweiseitigen *Mann-Whitney*-Tests zu erkennen, dass der Winkel der Pyramidenzellen des Abp1-KO im Vergleich zum WT von $40,17^\circ \pm 0,73^\circ$ auf $43,61^\circ \pm 0,86^\circ$ signifikant anstieg ($p < 0,01$); dies entsprach einer relativen Zunahme von 9 % (Abbildung 22 im Anhang; F).

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen in Schicht II/III des Sensorischen Cortex der Abp1-KO-Mäuse Dendritenbäume, die kürzer und weniger verzweigt waren, ein geringeres Gesamtvolumen besaßen und dabei auch größere Verzweigungswinkel aufwiesen. Allgemein war hier demnach von Pyramidenzellen mit verringerter Komplexität auszugehen.

5.2.4 Abp1-KO Mäuse besitzen eine reduzierte Komplexität des Dendritenbaumes in Schicht V des Sensorischen Cortex

Analog zu Schicht II/III wurden Pyramidenzellen auch in Schicht V des Sensorischen Cortex untersucht.

Die Analyse nach Sholl zeigte hier nach Auswertung der Mittelwerte aller Einzelwerte der beiden Genotypen für jeden Radius zwischen 10 μm und 100 μm keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 18). Bei einer Entfernung von 30 μm bis zur Entfernung von 100 μm vom Startpunkt liefen beide Graphen ähnlich wie in Schicht II/III annähernd parallel, zeigten jedoch zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied. Generell betrachtet lagen die Maximalwerte der dendritischen Schnittpunkte mit

den projizierten Ringen in Schicht V der WT-Mäuse ähnlich wie in Schicht II/III bei etwa 7 dendritischen Schnittpunkten pro Zelle bei einem Radius von 30 μm . Detaillierte Werte der dendritischen Schnittpunkte aller Radii (Abstände vom Zellsoma) finden sich im Anhang (Tabelle 13 im Anhang).

Eine Untersuchung der Häufigkeiten der Verzweigungslevel mithilfe einer *Two-Way-ANOVA* zeigte lediglich auf Ebene des dritten Verzweigungslevels eine signifikante Differenz ($p < 0,01$) der Häufigkeiten zwischen WT und Abp1-KO (Abbildung 19; A). Hier fanden sich $4,74 \pm 0,39$ Segmente dritten Verzweigungslevels im WT, im Abp1-KO jedoch nur $3,23 \pm 0,33$ Segmente.

Eine verringerte Komplexität in Schicht V spiegelte sich im zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test der Unterschiede der Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle in WT und Abp1-KO wider (Abbildung 18; B). Der Mittelwert des Abp1-KO nahm hier signifikant ($p < 0,001$) um etwa 25 % (Abbildung 23 im Anhang; A) von $14,25 \pm 0,58$

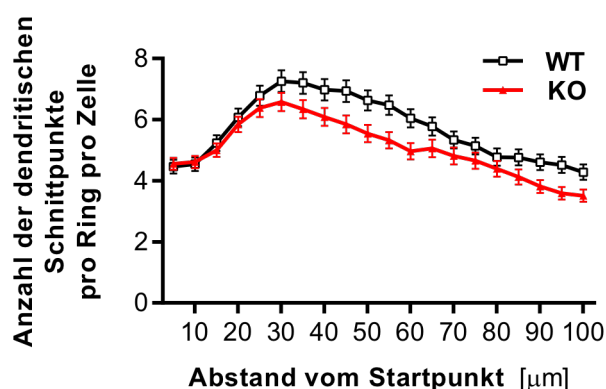


Abbildung 18 Analyse von Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO-Mäusen nach Sholl

Die Grafik zeigt die Analyse von Dendritenbäumen nach Golgi-gefärbter Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex nach Sholl bei einem Abstand der Ringe von 5 μm . Analysiert wurden 89 Zellen aus drei 25 Wochen alten WT-Tieren und 90 Zellen aus drei Abp1-KO-Tieren. Mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software wurden die Werte beider Genotypen für jeden Radius (Abstand vom Startpunkt) aufgetragen und mithilfe einer *Two-Way-ANOVA* mit Bonferroni-Posttest ($CI=95\%$) ausgewertet. In der Grafik sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Detaillierte Werte der Schnittpunkte aller Abstände vom Zellsoma finden sich im Anhang (Tabelle 13 im Anhang).

dendritischen Verzweigungspunkten pro Zelle im WT auf $10,74 \pm 0,48$ dendritischen Verzweigungspunkten pro Zelle ab.

Auch in Schicht V wurden die Gesamtlänge des Dendritenbaumes, die mittlere Segmentlänge pro Zelle, die Anzahl der Segmente pro Zelle, das Gesamtvolumen des Dendritenbaumes sowie der mittlere Verzweigungswinkel pro Zelle bestimmt (Abbildung 19; C-G). Ähnlich wie in Schicht II/III des Sensorischen Cortex zeigte sich auch hier ein deutlich verkürzter Dendritenbaum im Abp1-KO bei Analyse mittels zweiseitigem *Mann-Whitney-Test*. Die Länge des Dendritenbaumes verringerte sich signifikant ($p < 0,01$) von $1337 \pm 49 \mu\text{m}$ auf $1107 \pm 39 \mu\text{m}$. Dies entsprach einer Reduktion im Abp1-KO von etwa 17 % (Abbildung 23 im Anhang; B).

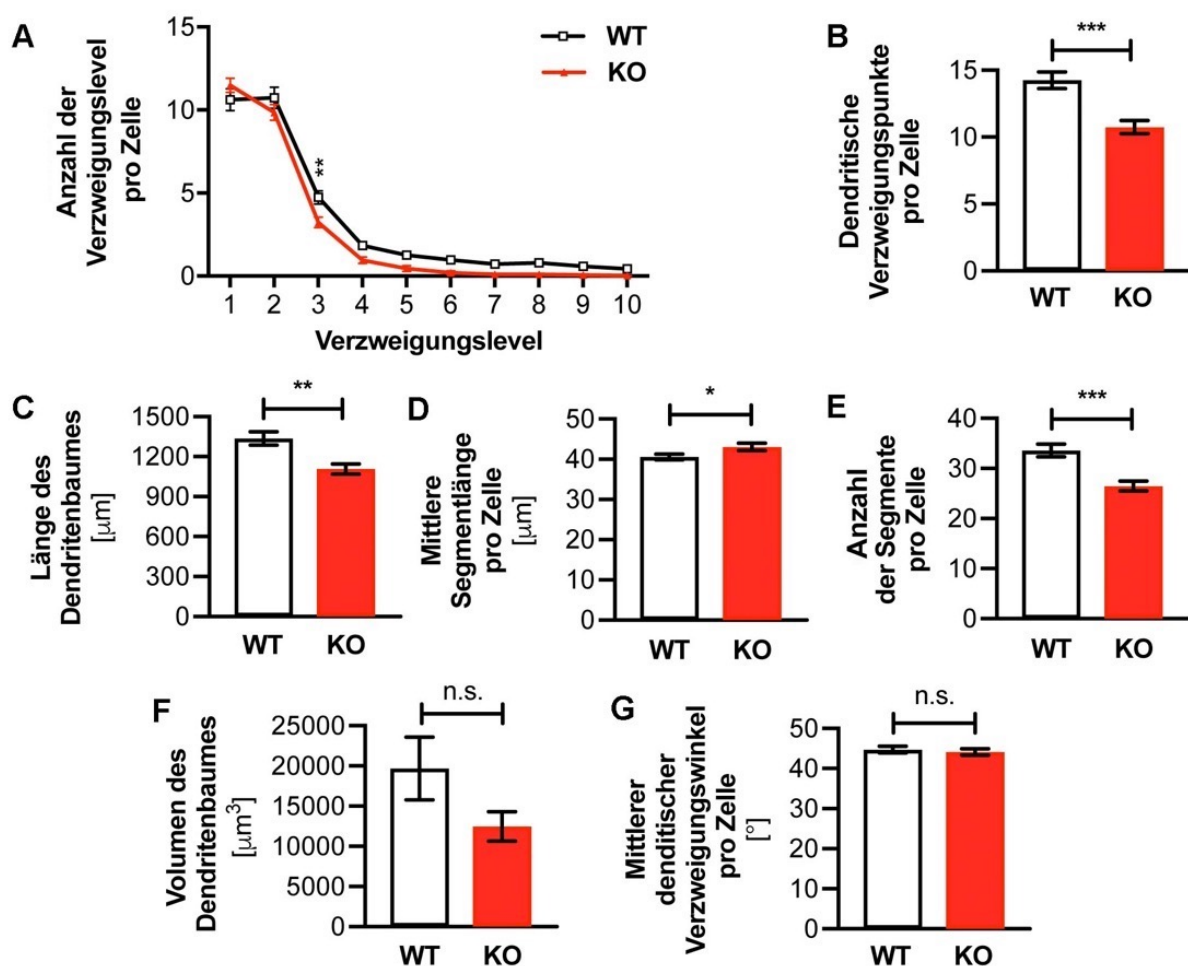


Abbildung 19 Vergleich verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO-Mäusen A Gezeigt ist die Analyse der Verzweigungslevel von jeweils drei 25 Wochen alten WT (n=89) und Abp1-KO (n=90). Die Mittelwerte der Einzelwerte beider Genotypen wurden für jedes Verzweigungslevel einzeln aufgetragen und mithilfe einer *Two-Way-ANOVA* mit Bonferroni-Posttest (CI=95%) ausgewertet. Mittelwerte \pm SEM der einzelnen Verzweigungslevel beider Genotypen finden sich im Anhang (Tabelle 14 im Anhang).

B-G Gezeigt ist der Vergleich der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle (**B**), der Länge der Dendritenbäume (**C**), der mittleren Segmentlänge pro Zelle (**D**), der Gesamtvolumina der Dendritenbäume (**F**) sowie des mittleren Verzweigungswinkels pro Zelle (**G**) mittels zweiseitigen

Mann-Whitney-Test und der Vergleich der Anzahl der Segmente pro Zelle (**E**) mittels *student's t-test*. Ausgewertet wurden die Dendritenbäume von Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex in WT (n=89) und Abp1-KO-Mäusen (n=90).

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0-Software*. In allen Grafiken sind die Mittelwerte aller Einzelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveaus entsprechen * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$ und n.s. für nicht signifikante Ergebnisse.

Die Untersuchung der mittleren Segmentlänge pro Zelle ergab im Abp1-KO eine gering signifikante Zunahme ($p < 0,05$) um etwa 6 % (Abbildung 23 im Anhang; C) von $40,56 \pm 0,74 \mu\text{m}$ auf $43,05 \pm 0,91 \mu\text{m}$ im Vergleich zum WT. Die Anzahl der Segmente pro Zelle nahm signifikant ($p < 0,001$) bei Auswertung mittels *student's t-test* im Abp1-KO um etwa 21 % (Abbildung 23 im Anhang; D) von $33,60 \pm 1,29$ Segmenten pro Zelle auf $26,48 \pm 0,98$ Segmente pro Zelle ab. Der Vergleich der Gesamtvolumina der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V in beiden Genotypen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ebenso zeigte der Vergleich der mittleren Verzweigungswinkel konträr zu den Beobachtungen aus Schicht II/III in Schicht V keine signifikanten Ergebnisse.

Es ließ sich durch die Analyse ein deutlicher phänotypischer Unterschied der Dendritenbäume der Pyramidenzellen zwischen WT und dem Abp1-KO in den Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex erkennen. Die Pyramidenzellen der Schicht II/III zeigten bei einem Fehlen von Abp1 einen weniger komplexen und verkürzten Dendritenbaum. Einen ähnlichen Phänotyp mit ebenfalls verkürztem Dendritenbaum und einer reduzierten Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten stellten auch die Ergebnisse der Analyse in Schicht V dar. In Schicht V scheint vorrangig ein Defekt der Verzweigung des Dendritenbaumes vorzuliegen.

6 Diskussion

6.1 Der Abp1-KO führt *in vivo* zu reduzierter hippocampaler Dornfortsatzdichte und zu morphologischen Veränderungen der Dornfortsatzköpfe

Das dynamische Aktincytoskelett, das die Zellmorphologie und Membrantopologie von Neuronen bestimmt, muss für diese Aufgabe genau kontrolliert werden. Ausschlaggebend hierfür ist das korrekte Zusammenspiel verschiedenster regulatorischer Proteine (Hering und Sheng 2001, Haeckel et al. 2008, Kessels et al. 2011, Kessels et al. 2000, Chen et al. 2014, Matus 2000, Lefebvre et al. 2015). Ein Akteur, der regulatorische Proteine der cytoskelettalen Maschinerie wie beispielsweise den Arp2/3-Komplex, N-WASP oder Proteine der Scar/WAVE-Familien binden kann, ist das akzessorische Aktin-bindende Protein Abp1 (Larbolette et al. 1999, Lappalainen et al. 1998, Kessels et al. 2011, Kessels et al. 2001, Kessels et al. 2000, Connert et al. 2006, Koch et al. 2014, Koch et al. 2012). Durch die Untersuchung der Zellmorphologie pyramidalen sowie hippocampaler Neurone unter Abp1-KO konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse zur Rolle des Proteins in der Ausbildung Aktin-reicher neuronaler Zellstrukturen gewonnen werden.

Besonders für die Ausbildung und Morphologie dendritischer Dornfortsätze ist das Aktincytoskelett von großer Bedeutung (Matus 2000, Matus 1999, Fischer et al. 1998). Diese *in vivo* etwa bis 2 µm langen Zellauswüchse (Harris und Kater 1994, Harris 1999, Chicurel und Harris 1992) tragen den Großteil der exzitatorischen Postsynapsen (Sheng und Hoogenraad 2007, Matus et al. 2000).

Die vergleichende Analyse hippocampaler Dornfortsätze von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus von WT und Abp1-KO-Mäusen zeigte im Abp1-KO eine deutlich erniedrigte Gesamtdornfortsatzdichte, wobei sowohl die Anzahl der reifen, pilzförmigen und dünnen als auch der unreifen, filopodienähnlichen Dornen ähnlich stark abnahm.

Der Effekt einer verringerten Dornfortsatzdichte zeigte sich am stärksten durch eine Abnahme der Anzahl filopodienähnlicher Dornen. Lediglich die Gruppe der stummelförmigen Dornen zeigte keine signifikante Abnahme, sodass die Verteilung der Morphologieklassen im Abp1-KO verändert war. Der Anteil der stummelförmigen Dornen nimmt signifikant ($p < 0,001$) zu, während der Anteil der filopodienähnlichen

Dornen weniger signifikant ($p < 0,01$) und der Anteil der dünnen Dornen gering signifikant ($p < 0,05$) abnimmt. Parallel dazu bleibt der Anteil der reifen, pilzförmigen Dornen jedoch unverändert.

Für diese spezifischen Effekte sind zwei Erklärungen denkbar. Da die Morphologie dendritischer Dornfortsätze von einer Reorganisation ihres dynamischen Aktincytoskeletts im Sinne einer Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin abhängig ist (Fischer et al. 1998), könnte eine Störung der regulierten Neuordnung der Komponenten des dynamischen Aktincytoskeletts zu einer generellen Störung der Ausbildung der Dornfortsätze führen. Ebenso ist es aber denkbar, dass eine gestörte Reorganisation des dynamischen Aktincytoskeletts nicht oder nicht nur in einer generellen Bildungsstörung sondern auch in einer Störung der Reifung der Dornfortsätze resultiert. Letzteres sollte eine Störung der Ausbildung der Morphologie vor allem der reifen, pilzförmigen Dornfortsätze bewirken.

Zur Prüfung der Hypothese einer Reifungsstörung der Dornfortsätze im Abp1-KO ist vor allem der Anteil der einzelnen Klassen an der Gesamtdichte zu betrachten, da diese verschiedenen funktionalen Entwicklungsstadien zugeschrieben werden können. Die Bedeutung der filopodienähnlichen Dornen wird generell kontrovers diskutiert. Man nimmt jedoch an, dass diese während der postnatalen Entwicklung frühzeitig im Rahmen der Synapsenbildung entstehen und sich später wieder zurückbilden (Yuste 2010, Vaughn 1989, Fiala et al. 1998). Ihre Rolle in der Synapsenbildung im adulten Gehirn ist nicht eindeutig geklärt (Sorra und Harris 2000), sie werden jedoch als Vorläufer dendritischer Dornfortsätze angesehen (Hering und Sheng 2001). Eine fehlende Reifung der Dornen sollte sich nach dieser These in einem erhöhten Anteil filopodienähnlicher Dornfortsätze widerspiegeln. Diese Verteilung ist bereits bei mehreren Krankheiten mit mentaler Retardierung wie etwa beim Down-Syndrom, dem fragilen X-Syndrom oder dem fetalen Alkoholsyndrom nachgewiesen worden (Sorra und Harris 2000, Harris 1999, Penzes et al. 2011). In der Entwicklung werden diese durch die stummelförmigen Dornfortsätze ersetzt, während später auf reifen Neuronen, wie sie hier ausgewertet wurden, dünne und vor allem pilzförmige Dornfortsätze vorherrschen (Hering und Sheng 2001, Fiala et al. 1998). Die prozentuale Verteilung der Morphologieklassen im Abp1-KO zeigte in der Analyse keine Änderung hinsichtlich der pilzförmigen Dornfortsätze, sodass diese mit knapp 50 % in beiden Genotypen den Großteil – gefolgt von den dünnen Dornfortsätzen -

ausmachen. Im Vergleich mit dem WT war im Abp1-KO jedoch zeitgleich eine signifikante Abnahme des Anteils der filopodienähnlichen Dornfortsätze ($p < 0,01$) und eine signifikante Zunahme des Anteils der stummelförmigen Dornfortsätze ($p < 0,001$) zu verzeichnen. Fasst man diese beiden Morphologieklassen jedoch zusammen, so blieben die unreifen Dornfortsätze in der Summe gleich. Daher scheint eine Reifungsstörung nicht wahrscheinlich. Die starke absolute Abnahme der Dichte der filopodienähnlichen Dornfortsätze sowie die Abnahme ihrer Häufigkeit bekräftigen diese These. Für eine Reifungsstörung dagegen würde sprechen, dass die Dichte der stummelförmigen Dornfortsätze im Abp1-KO als einzige Morphologiekategorie verglichen mit dem WT nicht signifikant abnimmt. Dieser Effekt könnte jedoch auch die Folge eines gestörten Längenwachstums der dendritischen Dornfortsätze sein, sodass die relative Häufigkeit dieser Morphologiekategorie ansteigt.

Ein Vergleich dieser Effekte auf die Dornfortsatzdichten bei Abp1-KO im Vergleich zu WT mit *knockdown*-Experimenten an primären hippocampalen Rattenneuronen von Haeckel et al. (2008) zeigt Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf. Die Gesamtdichte der Dornfortsätze der hippocampalen Neurone, die mit zwei verschiedenen RNAi-Konstrukten transfiziert wurden, zeigte im Vergleich zu den Neuronen der Kontrollgruppe keinen Unterschied. Eine detailliertere Untersuchung der Neurone mit reduzierter Abp1-Expression ergab jedoch eine signifikant reduzierte Häufigkeit der pilzförmigen Dornen um 47 % bzw. 35 %, während die Häufigkeit der dünnen und filopodienähnlichen Dornen anstieg. In Rettungsexperimenten mit einer RNAi-resistenten Abp1-Mutante konnte der Effekt des *knockdowns* aufgehoben werden. Überexpressionsexperimente im Rahmen derselben Studie führten bei Überexpression des gesamten Proteins zu einer erhöhten Dichte der pilzförmigen Dornen und zu einer Zunahme ihrer relativen Häufigkeit. Überexpression der beiden F-Aktin-bindenden Domänen ohne die SH3-Domäne von Abp1 hingegen führte zu einer deutlich verringerten Dichte an pilzförmigen Dornen. Die Überexpression der SH3-Domäne alleine resultierte in einer Abnahme der Dichte pilzförmiger Dornen, wohingegen die Dichte der dünnen und filopodienähnlichen Dornen unverändert blieb. Haeckel et al. (2008) schlussfolgerten aus diesen Ergebnissen, dass sowohl die Aktin-bindende als auch die SH3-Domäne von Abp1 eine Rolle für die Bildung der Dornfortsatzköpfe der pilzförmigen Dornen im Zuge der Reifung spielen. Eine Überexpression der SH3-Domäne von Abp1 führte zu einem Längenwachstum pilzförmiger, dünner und filopodienähnlicher Dornen, während eine Überexpression

des gesamten Proteins nur zu einem Längenwachstum pilzförmiger Dornen führte. Ein Abp1-KO könnte nach dieser These trotz eines nicht veränderten relativen Anteils der pilzförmigen Dornen bei jedoch verringerter Gesamtdornfortsatzdichte zu einer gestörten Ausbildung der Dornfortsatzköpfe sowie wie einem gestörten Längenwachstum und damit einer veränderten Morphologie des Abp1-KO verglichen mit dem WT führen.

Die morphometrische Untersuchung der dendritischen Dornfortsätze hippocampaler Neurone der CA1 Region zeigte im Abp1-KO deutliche Auffälligkeiten im Vergleich zum WT. Die Kopfweite der pilzförmigen Dornen war im Abp1-KO signifikant reduziert, während die der stummelförmigen und der dünnen Dornen keine Unterschiede zum WT aufwiesen. Es nahm ebenfalls das Kopfvolumen der pilzförmigen sowie der dünnen Dornen signifikant ab, wohingegen das Kopfvolumen der stummelförmigen Dornen unverändert blieb. Auch die Dornfortsatzlänge der stummelförmigen Dornen war im Abp1-KO nicht verändert, während die Dornfortsatzlängen der übrigen Morphologieklassen Dornen mit gleicher Signifikanz abnahmen. Dies könnte auf ein gestörtes Längenwachstum der Dornfortsätze und eine Störung der generellen Ausbildung der Dornfortsätze unter Abp1-KO hinweisen.

Eine Erklärung für die auffällig verkleinerten Köpfe der pilzförmigen Dornfortsätze der Neurone im Abp1-KO könnten die Ergebnisse weiterer Überexpressionsexperimente von Haeckel et al. (2008) liefern. Im postsynaptischen Kompartiment assoziiert Abp1 über seine SH3-Domäne direkt mit den Gerüstproteinen der PSD wie z.B. den Proteinen der ProSAP/Shank-Familie (Qualmann et al. 2004). Die Zunahme der Dornfortsatzlänge pilzförmiger Dornen durch Überexpression von Abp1 konnte durch gleichzeitige Überexpression der Abp1 Bindungspartner ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3 ausgelöscht werden. Dies deutet darauf hin, dass ein streng kontrolliertes Gleichgewicht der postsynaptischen Proteine für die Entwicklung der Dornfortsätze wichtig ist. Gleichzeitig kam es durch die gemeinsame Überexpression von Abp1 und ProSAP1/Shank2 sowie ProSAP2/Shank3 auch zu einer Zunahme der Kopfweite der pilzförmigen Dornen von etwa 20 %. Bei Überexpression der beiden Akteure unabhängig voneinander war dieser Effekt nicht zu beobachten. Haeckel et al. (2008) schlussfolgerten, dass eine Störung der Formierung des Abp1-ProSAP-Komplexes über die SH3-Domäne von Abp1 zu einer Verringerung der durch das postsynaptische Gerüstprotein ProSAP gesteuerten Kopfbildung führt.

Die Kopfbildung von Dornfortsätzen ist weiterhin auch von der Arp2/3-Komplex gesteuerten Aktin-Polymerisation abhängig (Wegner et al. 2008, Spence et al. 2016), wobei der Arp2/3-Komplex wiederum durch das von Abp1 kontrollierte Protein N-WASP aktiviert werden kann (Haeckel et al. 2008, Pinyol et al. 2007). In hippocampalen Schnittkulturen, entnommen aus Mäusen mit einem KO der Untereinheit ArpC3 des Arp2/3-Komplexes am Tag der Geburt, fand sich eine Reduktion der Gesamtdornfortsatzdichte um 68 % verglichen mit dem WT (Spence et al. 2016). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Abp1-KO-Mäuse und der *knockdown*-Experimente von Abp1 sowie der ArpC3-KO-Mäuse deuten auf ein komplexes Zusammenspiel einzelner Proteine hin, das die Bildung der Dornfortsatzköpfe steuert.

Die unterschiedlichen Effekte des Abp1-KO und des Abp1-*knockdowns* auf die Gesamtdornfortsatzdichte und den Anteil der reifen, pilzförmigen Dornen könnten durch die Funktionen anderer Proteine, die mit dem dynamischen Aktincytoskelett assoziiert sind, entstehen. Im Rahmen eines *knockdown*-Experiments wird kurzfristig in die cytoskelettale Maschinerie einzelner Neurone eingegriffen, wodurch langfristige Folgen des Verlusts eines bestimmten Proteins nicht beurteilt werden können.

Es ist möglich, dass der Effekt, der durch den KO eines einzelnen Proteins der Maschinerie auftritt, durch veränderte Menge und/oder Aktivität anderer Akteure kompensiert werden könnte. Ist das korrekte Zusammenspiel einzelner Komponenten der Maschinerie jedoch unabdingbar für die Funktion dieser Proteine, könnte das Fehlen verschiedener Akteure zu ähnlichen Effekten führen. Der Vergleich mit dem ArpC3-KO (Spence et al. 2016) mit dem Abp1-KO zeigte ähnliche Auswirkungen auf die Dornfortsatzdichte. Neben dem Arp2/3-Komplex als indirektem Interaktionspartner von Abp1 in der Maschinerie des dynamischen Aktincytoskeletts der Postsynapse könnten auch die direkten Interaktionspartner von Abp1 und dem Arp2/3-Komplexes N-WASP oder Scar/WAVE (Pinyol et al. 2007, Koch et al. 2012) in ihrer Aktivität oder Menge verändert sein. Ein KO dieser Proteine könnte zu einer gestörten Regulation des dynamischen Aktincytoskeletts und somit zu ähnlichen Auffälligkeiten der Morphologie der Neurone wie der Abp1-KO führen, da das dynamische Aktincytoskelett und seine Regulatoren eine essentielle Rolle in der Formgebung von Zellen, in der Zell-Zell-Adhäsion, in der Migration von Zellen und in der Zellproliferation spielen (Dominguez 2010, Lee und Dominguez 2010, Lian und Sheen 2015).

Gehirnspezifischer KO von N-WASP durch Kreuzung von N-WASP^{fl/fl}-Mäusen mit Nestin-Cre-Mäusen (NKO-Nes-Mäuse) (Jain et al. 2014) führte bei diesen Tieren zu Hydrocephali begleitet von kranialen Deformitäten und einer deutlich verringerten Anzahl an Zilien an der Oberfläche der Ependymzellen des Gehirns. Darüber hinaus war in NKO-Nes-Mäusen die Cortexdicke reduziert. Im Cytoskelett der Zilien ist der Basalkörper mit Mikrotubuli und Aktin assoziiert (Brooks und Wallingford 2014). Eine gestörte Regulation des dynamischen Aktincytoskeletts durch ein Fehlen von N-WASP während der Entwicklung des ZNS könnte der Grund für die geringe Zilienbildung sein (Jain et al. 2014), wohingegen die reduzierte Cortexdicke durch eine gestörte Migration der Neuroepithelzellen während der Cortexbildung entstehen könnte (Lian und Sheen 2015). Hydrocephali wurden im Rahmen der Charakterisierung der Abp1-KO-Mäuse (Connert et al. 2006) nicht beschrieben. Zukünftig könnte die Cortexdicke der Abp1-KO-Mäuse ausgemessen sowie die Zilien der Ependymzellen untersucht werden, um weitere Erkenntnisse einer Abp1-Defizienz zu sammeln und diese weitergehend mit den NKO-Nes-Mäusen vergleichen zu können. Zur Dichte oder Morphologie der dendritischen Dornfortsätze der Pyramidenzellen des Hippocampus oder des Cortex von NKO-Nes-Mäusen gibt es aktuell keine Daten. Der *knockdown* von N-WASP durch Transfektion primärer, hippocampaler Rattenneurone mit einem RNAi-Konstrukts resultierte in einer deutlich reduzierten Dornfortsatzdichte dieser Neurone (Wegner et al. 2008). Sowohl die Transfektion hippocampaler Rattenneurone mit einem N-WASP-Konstrukt ohne die den Arp2/3-Komplex bindende Domäne als auch der direkte *knockdown* von Arp3 resultierten in einer verringerten Gesamtdornfortsatzdichte um etwa 15 % (Wegner et al. 2008). Diese Abnahme der Gesamtdornfortsatzdichte ist damit geringer als die des Abp1-KO, die etwa 32 % betrug. Verglichen mit den Abp1-*knockdown*-Experimenten, in denen sich nur die Dichte der pilzförmigen Dornen, nicht aber die Gesamtdornfortsatzdichte änderte, ist die Abnahme der Gesamtdornfortsatzdichte jedoch größer.

In Golgi-gefärbten Gehirnschnitten von zehn Wochen alten Mäusen konnte im WAVE1-KO verglichen mit dem WT eine Reduktion der Gesamtdornfortsatzdichte der Dendriten der Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus und der Schicht I des Cortex um 20 % nachgewiesen werden (Soderling et al. 2007). Im Hippocampus ist die Reduktion der Dornfortsatzdichte mit 20 % hier niedriger als im Abp1-KO. Um die Auswirkungen des WAVE1-KO verglichen mit dem Abp1-KO weiter vergleichen zu

können, könnte künftig analog die Dornfortsatzdichte der Dendriten der Pyramidenzellen des Cortex ausgewertet werden.

Neben dem Aktin-bindenden und –stabilisierenden Protein Abp1 ist bereits eine Vielzahl an mit Aktin assoziierten Proteinen unterschiedlicher Proteinfamilien beschrieben und untersucht worden (Pollard und Cooper 1986, dos Remedios et al. 2003, Lin und Webb 2009), die unterschiedlichste Funktionsmechanismen und Interaktionen mit dem Aktincytoskelett aufweisen (dos Remedios et al. 2003) und die Funktionen von Abp1 in gewissem Maße ersetzen oder kompensieren könnten. Cortactin (Wu und Parsons 1993) ist beispielsweise ein Protein, das ebenfalls den Arp2/3-Komplex aktivieren und neu gebildete, verzweigte Aktinfilamente während der Aktinpolymerisation stabilisieren kann (Weed et al. 2000, Weaver et al. 2001, Urano et al. 2001). Der *knockdown* von Cortactin in kultivierten hippocampalen Rattenneuronen führte zu einer Reduktion der Gesamtdornfortsatzdichte um 67 %, während die Überexpression von Cortactin in hippocampalen, inhibitorischen Interneuronen in Kultur zur Ausbildung kleiner, filopodienähnlicher Zellauswüchse führte (Hering und Sheng 2003). Eine verstärkte Aktivierung von Cortactin könnte in den Neuronen des Abp1-KO möglicherweise die fehlende Funktion von Abp1 zu gewissen Teilen ersetzen, was in der Ausbildung von dendritischen Dornfortsätzen resultieren und den beschriebenen Abp1-KO-Phänotypen abschwächen könnte.

Die phänotypische Vielfalt der verschiedenen KO-Tiere sowie die Phänotypen der kultivierten Neurone verschiedener *knockdown*-Experimente machen deutlich, dass unterschiedliche Modulationen miteinander interagierender Proteine sowohl überlappende als auch distinkte Auswirkungen haben. So resultiert eine Defizienz von direkt wie indirekt mit Abp1-assoziierten Proteinen ebenso wie eine Abp1-Defizienz selbst in einer generell reduzierten Dornfortsatzdichte. Es ist möglich, dass einzelne Proteine bei Ausfall eines anderen Akteurs kompensatorisch wirken und den Effekt abschwächen. Der Abp1-KO zeigt jedoch, dass *in vivo* eine Kompensation nicht nur nicht möglich zu sein scheint, prinzipiell könnte der Effekt über die Zeit nicht kompensiert, sondern möglicherweise verstärkt werden. Um dies beurteilen zu können, könnten künftig zusätzlich die dendritischen Dornfortsätze jüngerer Abp1-KO-Mäuse hinsichtlich Dichte und Morphologie untersucht werden.

Eine Bildungsstörung der Dornfortsätze könnte auch durch präsynaptische Effekte verursacht werden (Wefelmeyer et al. 2016). Abp1 ist sowohl prä- als auch

postsynaptisch lokalisiert (Qualmann et al. 2004, Kessels et al. 2001, Kessels et al. 2000, Connert et al. 2006) und interagiert neben den Komponenten des Aktincytoskeletts mit Komponenten der endocytotischen Maschinerie wie beispielsweise Dynamin 1 (Kessels et al. 2001) und Proteinen der Aktiven Zone der Präsynapse wie beispielsweise Piccolo (Fenster et al. 2003). Ein Fehlen des Proteins Abp1 könnte präsynaptisch durch reduziertes Vesikelrecycling die synaptische Transmission beeinflussen (Connert et al. 2006). Geht man wie im *Miller-Peters-Model* (Miller und Peters 1981) davon aus, dass die Dornfortsatzbildung durch bereits bestehende axonale Endigungen induziert wird, wird bei Beeinträchtigung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung auch die Postsynapse beeinflusst. In den synaptischen Endigungen kultivierter hippocampaler, Abp1-defizienter Mausneurone wurde eine reduzierte Menge an wieder aufgenommenen synaptischen Vesikeln besonders bei länger andauernder Stimulation gezeigt (Connert et al. 2006). Es könnte durch den Abp1-KO zur abgeschwächten Signalübertragung von Prä- auf Postsynapse kommen, die trotz funktionierender Mechanismen der Dornfortsatzbildung in einer verringerten Ausbildung postsynaptischer Kompartimente resultiert. Hier könnten künftig elektrophysiologische Experimente helfen, Aufschluss zu geben, ob die Signalübertragung von Prä- zu Postsynapse gestört ist. Verglichen mit den Ergebnissen der Abp1-*knockdown*-Experimente von Haeckel et al. (2008), die bei einer geringen Transfektionseffizienz von etwa 56 % dennoch quantitative sowie morphologische Auffälligkeiten der Dornfortsätze zeigen, scheint die Auswirkung der Abp1-Defizienz in der Postsynapse für die beobachteten Effekte des Abp1-KO eine wahrscheinlichere Erklärung darzustellen.

Abp1 scheint zusammenfassend eine Rolle in der Ausbildung dendritischer Dornen einzunehmen. Es scheint auch die Bildung von postsynaptischen Kompartimenten zu beeinflussen, da vor allem die Köpfe der pilzförmigen Dornen im Abp1-KO ein reduziertes Kopfvolumen sowie einen reduzierten Kopfdurchmesser aufwiesen. Vor allem die Reorganisation des dynamischen Aktincytoskeletts könnte durch eine Abp1-Defizienz beeinflusst werden.

6.2 Der Abp1-KO verursacht in Schicht II/III und V des Sensorischen Cortex Dendritenbäume der Pyramidenzellen mit reduzierter Komplexität

Die Morphologie der Neurone mit ihren elaborierten Dendritenbäumen scheint für die Komplexität und Integrität neuronaler Netzwerke ausschlaggebend zu sein (Chklovskii 2004). Morphologische Aspekte wie die Anzahl der Dendriten und ihre Verzweigung sind neben den Synapsen auf dem Dendriten wegweisend für die Funktion des neuronalen Netzwerks (Lefebvre et al. 2015).

Der Blick auf die gesamte Struktur des Dendritenbaumes wirft die Frage auf, ob eine Abp1-Defizienz gegebenenfalls die Morphologie des gesamten Neurons und seiner afferenten Strukturen verändert. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden die Schichten II/III und V des Cortex, die sich durch elaborierte Dendritenbäume auszeichnen (Chklovskii 2004), in WT und Abp1-KO Mäusen untersucht.

Die Untersuchung dieser Dendritenbäume der Pyramidenzellen des Sensorischen Cortex unter Abp1-KO zeigte in Schicht II/III allgemein einen Phänotyp mit deutlich reduzierter Komplexität, der durch eine Abnahme der Schnittpunkte der Ringe der Analyse nach Sholl mit dem Dendritenbaum zwischen einem Radius von 10 μm bis 60 μm , weniger Dendriten erster bis dritter Ordnung sowie eine reduzierte Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten pro Zelle auszeichnet. Es zeigte sich ein verkürzter Dendritenbaum mit verkürzten Segmenten bei einer erhöhten Anzahl an Segmenten, ein reduziertes Gesamtvolumen des Dendritenbaumes sowie ein vergrößerter mittlerer dendritischer Verzweigungswinkel. Die Morphologie der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex unter Abp1-KO war ebenfalls verändert. Verglichen mit Schicht II/III zeigte die Analyse nach Sholl in Schicht V keine signifikanten Unterschiede, während gleichzeitig die Anzahl der Dendriten des dritten Verzweigungslevels reduziert war. Auch die Gesamtvolumina der Dendritenbäume der Pyramidenzellen des Abp1-KO sowie der mittlere dendritische Verzweigungswinkel waren nicht verändert. Es zeigte sich zwar in Schicht V eine Reduktion des Gesamtvolumens des Dendritenbaumes von etwa 34 %, diese war aber aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte der analysierten Dendritenbäume der Pyramidenzellen aus drei verschiedenen WT-Mäusen nicht signifikant. Analog zu Schicht II/III waren die Dendritenbäume ebenfalls signifikant verkürzt und die mittlere Anzahl der Segmente pro Zelle signifikant erniedrigt.

Ein morphologisch veränderter Dendritenbaum, wie er im Falle der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex der Abp1-KO-Mäuse durch eine reduzierte Gesamtlänge und eine verringerte Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten charakterisiert ist, besitzt einen weniger ausgeprägten Dendritenbaum mit geringerer Oberfläche, die zur Informationsverarbeitung zur Verfügung stehen könnte. Dieser funktionelle Nachteil könnte durch Anpassung verschiedener morphologischer Parameter der Dendriten eines Netzwerks kompensiert werden. So würde sich die Oberfläche, die auf den Dendriten für die synaptische Übertragung zur Verfügung steht, nur unerheblich verändern, wenn beispielsweise der Durchmesser und damit das Volumen des gesamten Dendritenbaumes zunehmen würde. Ebenso würde die Oberfläche mit einer Verlängerung des gesamten Dendritenbaumes ansteigen. Die Untersuchungen des Abp1-KO zeigten im Vergleich mit dem WT ein gegenteiliges Ergebnis. Das Gesamtvolumen des Dendritenbaumes in Schicht II/III war signifikant um etwa 26% erniedrigt, was zu dem Schluss führt, dass eine Kompensation einer möglicherweise reduzierten Oberfläche für den Informationsaustausch durch eine Zunahme des Dendritendurchmessers unwahrscheinlich ist. Ein weniger komplexer Dendritenbaum mit einer reduzierten Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten kann durch größere Verzweigungswinkel möglicherweise kompensatorisch mehr Fläche im Cortex, auf der Kontakt mit Axonen afferenter Neurone hergestellt werden kann, abdecken und so Distanzen zwischen den Neuronen verkleinern. Die Dendritenbäume der Pyramidenzellen in Schicht II/III des Sensorischen Cortex der Abp1-KO-Mäuse schienen kompensatorisch einen vergrößerten mittleren Verzweigungswinkel von etwa 9 % aufzuweisen.

Auch der Vergleich der Gesamtlängen der Dendritenbäume von WT und Abp1-KO zeigte in Schicht II/III keine Veränderung, die auf eine Kompensation hinweisen würde. Es konnte parallel zur um etwa 34 % reduzierten Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle eine signifikante Abnahme der Gesamtlänge des Dendritenbaumes im Abp1-KO um etwa 19 % beobachtet werden. Hierbei waren die Segmente um etwa 14 % verlängert, ihre Anzahl jedoch um etwa 30 % reduziert. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei einer verringerten Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten pro Zelle die Länge der Segmente zunimmt, um eine größere Fläche im Cortex abdecken zu können und mehr synaptische Kontakte mit weiter entfernten Axonen knüpfen zu können. Dieser Effekt scheint jedoch ein Fehlen von

Abp1 allenfalls teilweise und damit nicht ausreichend kompensieren zu können, da die Abp1-Defizienz nicht nur zu weniger komplexen sondern ebenso verkürzten Dendritenbäumen führte.

In Schicht V des Sensorischen Cortex zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp der Dendritenbäume der Pyramidenzellen. Die Länge der Dendritenbäume nahm um etwa 17 % ab, die Zunahme der mittleren Segmentlänge in Schicht V war dagegen mit 6 % nur gering signifikant ($p < 0,05$), während die mittlere Anzahl der Segmente pro Zelle um 21 % abnahm. Die Abnahme der Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte war mit etwa 24 % ebenfalls geringer als in Schicht II/III.

Zusammenfassend könnte dies bedeuten, dass unter Abp1-KO in Schicht II/III des Sensorischen Cortex Pyramidenzellen mit weniger komplexen Dendritenbäumen entstehen, die vor allem in der Nähe zum Soma eine verstärkt reduzierte Verzweigung der Dendriten aufweisen. Dies wird durch die Analyse nach Sholl und den Vergleich der Häufigkeiten der Verzweigungslevel deutlich. Die Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex weisen ebenfalls eine verringerte Komplexität auf, die sich jedoch in keinem distinkten Bereich des Dendritenbaumes signifikant niederschlägt. Verkürzte Dendritenbäume und/oder eine reduzierte Anzahl an Segmenten pro Zelle finden sich beispielsweise auch in präfrontalen Hirnregionen an Schizophrenie erkrankter Menschen (Moyer et al. 2015). Die morphologisch veränderten Dendritenbäume könnten weniger Oberfläche für die Bildung von Synapsen bieten. Geht man davon aus, dass der Großteil der synaptischen Kontakte vor allem auf dendritischen Dornfortsätzen liegt (Penzes et al. 2011, Niesmann et al. 2011, Hering und Sheng 2001, Harris und Kater 1994, Bosch und Hayashi 2012, Alvarez und Sabatini 2007, Sala und Segal 2014), könnte eine Verkürzung des dendritischen Baumes der Pyramidenzellen im Neocortex auch durch eine gesteigerte Dornfortsatzdichte auf den Pyramidenzellen dieser Schichten kompensiert werden. Im Anschluss an diese Arbeit, deren Fokus auf die Morphologie der Dendritenbäume gelegt wurde, um einen Überblick über die gesamten afferenten Strukturen der Pyramidenzellen zu gewinnen, könnte künftig die Dornfortsatzdichte der Pyramidenzellen untersucht werden. Im Hippocampus der Abp1-KO-Mäuse wurde jedoch im Vergleich zum WT eine reduzierte Dornfortsatzdichte festgestellt. Unter der Annahme einer generellen Bildungsstörung könnte auch im Cortex eine reduzierte Dornfortsatzdichte erwartet werden.

Ursächlich für die morphologischen Veränderungen der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex des Abp1-KO könnte ein Fehlen von Abp1 während der Dendritogenese sein. Die Immunfluoreszenzfärbung primärer, hippocampaler Neurone zeigt während der Entwicklung in Kultur nachweislich ein Signal des anti-mAbp1-Antikörpers in den entstehenden Dendriten sowie dem Axon (Qualmann et al. 2004). Wie die Immunfluoreszenz der jungen murinen Cortexneurone zeigte, ist Abp1 in Wachstumskegeln angereichert. Auch in den Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex adulter Mäuse konnte Abp1 in den Dendriten der corticalen Pyramidenzellen nachgewiesen werden.

Abp1 stabilisiert und moduliert das dynamische Aktincytoskelett (Kessels et al. 2011, Kessels et al. 2001, Kessels et al. 2000, Pinyol et al. 2007, Koch et al. 2014, Koch et al. 2012, Haeckel et al. 2008), das gemeinsam mit Mikrotubuli und Neurofilamenten das Cytoskelett der Dendriten bildet (Sainath und Gallo 2015, Konietzny et al. 2017) und für die Ausbildung von neuronalen Zellauswüchsen destabilisiert und wieder stabilisiert werden muss (Georges et al. 2008).

Da der Funktion des indirekt durch Abp1 über Interaktion mit N-WASP aktivierten Arp2/3-Komplexes aufgrund seines Vorkommens in neuronalen Wachstumskegeln eine wichtige Rolle für die Bildung von Filopodien und neuronalen Zellauswüchsen zugeschrieben wird (Korobova und Svitkina 2008, Pinyol et al. 2007, Strasser et al. 2004), könnte eine gestörte Funktion des Arp2/3-Komplexes auch zu einer Störung der Ausbildung der klassischen Morphologie neuronaler Dendritenbäume während der Entwicklung führen. Der Arp2/3-Komplex steuert die Verzweigung des Aktincytoskeletts in Lamellipodien (Squire et al. 2003). Der *knockdown* des gesamten Arp2/3-Komplexes in kultivierten, hippocampalen Rattenneuronen führte zu einer Reduktion des Aktin-Gehalts in entstehenden Filopodien und Lamellipodien verglichen mit der Kontrolle (Korobova und Svitkina 2008). Durch ein Fehlen von Abp1 in den Pyramidenzellen der Schicht II/III sowie Schicht V im Sensorischen Cortex der Abp1-KO-Mäuse könnte der Arp2/3-Komplex weniger stark über N-WASP aktiviert werden und seine Funktion gestört sein. Dass ein korrektes Zusammenspiel von Abp1, N-WASP und dem Arp2/3-Komplex ausschlaggebend für ein gerichtetes Wachstum des dynamischen Aktincytoskeletts und die Neuritenbildung ist, zeigten die Untersuchungen von Pinyol et al. (2007). Der *knockdown* von Abp1, N-WASP sowie Arp3 in kultivierten, hippocampalen Rattenneuronen führte zu einem ähnlichen

Phänotyp mit deutlich gesteigertem Längenwachstum des Axons. Die Gesamtlänge des Dendritenbaumes sowie die Anzahl der Dendriten und die Zahl der dendritischen Verzweigungspunkte war nach *knockdown* von Abp1 in diesen Neuronen jedoch nicht verändert. Da die Pyramidenzellen des Sensorischen Cortex sowohl in Schicht II/III als auch in Schicht V deutlich verkürzte Dendritenbäume sowie in beiden Schichten eine reduzierte Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten aufwiesen, scheint dies zunächst widersprüchlich. Es sollte daher allerdings bedacht werden, dass die kultivierten Neurone nach sechs Tagen in Kultur fixiert und ausgewertet wurden. Verglichen mit den corticalen Pyramidenzellen aus 25 Wochen alten Abp1-KO-Mäusen könnte der Phänotyp der Neurone des Abp1-KO zum einen im Laufe des Lebens der Maus entstehen und zum anderen abhängig von der Funktion des einzelnen Neurons im gesamten Netzwerk sein. Der Input der anderen Regionen des Gehirns in Schicht V bzw. der intercorticalen Assoziationsfasern in Schicht II/III könnte zum Phänotyp des Abp1-KO führen, in dem die Dendritenbäume der Pyramidenzellen des Abp1-KO sich verglichen mit dem WT schlechter an die Anforderungen des neuronalen Netzwerks anpassen und schlechter auswachsen können.

Untersuchungen mit dem Arp2/3-Komplex und Abp1 interagierender Proteine zeigten nicht dem Abp1-KO entsprechende Ergebnisse. In Golgi-gefärbten Gehirnschnitten von zwischen 21 und 24 Tagen alten WAVE1-KO-Mäusen schienen die Neurone der Schichten II/III und IV des Cortex verglichen mit dem WT morphologisch unauffällig, sodass die Rolle des Aktinnukleators WAVE1 während der neuronalen Morphogenese kritisch betrachtet werden kann (Dahl et al. 2003). Im Pilz *Dictyostelium discoideum* führte der KO von Scar nicht zu Störungen beim Auswachsen von Pseudopodien und somit nicht zu Problemen mit Wachstum, Migration oder Chemotaxis. An den Wachstumskegeln der Pseudopodien kam es zur Anreicherung von WASP, das im Pilz ein ähnliches Verhalten wie Scar zeigte und den Arp2/3-Komplex in den Wachstumskegeln aktivieren konnte (Veltman et al. 2012). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass auch in neuronalen Wachstumskegeln eine Störung des Signalweges über den Arp2/3-Komplex während der Dendritogenese durch andere Akteure kompensiert werden könnte, sodass der Ausfall eines bestimmten Proteins nicht notwendigerweise zu den beobachteten morphologischen Auffälligkeiten der Dendritenbäume führen würde. Eine mögliche Bildungsstörung der Dendriten im Rahmen der Anpassung der Pyramidenzelle an die Anforderungen des neuronalen Netzwerks sowie während der Entwicklung könnte durch eine gestörte Aktivierung des

Arp2/3-Komplexes nicht genügend erklärt werden. Es könnte jedoch Interaktionen von Abp1 mit anderen Proteinen geben, die das Dendritenwachstum nachhaltig beeinflussen könnten.

Cobl ist ein weiterer Aktinnukleator, der eine wichtige Rolle für die Dendritogenese und die Ausbildung des dendritischen Netzwerkes spielt, und der mit dem akzessorischen Protein Abp1 interagiert (Haag et al. 2012, Hou et al. 2015, Ahuja et al. 2007). Cobl unterstützt die Bildung unverzweigter Aktinfilamente (Ahuja et al. 2007) und interagiert mit Abp1 über dessen SH3-Domäne (Haag et al. 2012). Die Arbeit von Haag et al. (2012) zeigte durch verschiedene Experimente die Relevanz der Interaktion von Abp1 und Cobl. Beide Proteine kolokalisierten im Laufe der postnatalen Entwicklung *in vivo* in Wachstumskegeln der Dendritenbäume von Purkinje-Zellen. Ebenfalls zeigten *loss-of-function*-Experimente beider Proteine in Schnitten von Purkinje-Zellen des Kleinhirns jeweils weniger komplexe Dendritenbäume mit einer reduzierten Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten pro Zelle. Die Abp1-defizienten Purkinje-Zellen zeigten eine Abnahme der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle von etwa 62 % (Haag et al. 2012). Diese *in vitro* Experimente zeigen damit eine stärkere Reduktion als die Untersuchungen der Pyramidenzellen des Sensorischen Cortex des Abp1-KO (Schicht II/III: 34 %; Schicht V: 24 %). Die Dendritenbäume der Purkinje-Zellen wiesen durch *loss-of-function* von Cobl und Abp1 sowie beider Proteine gleichzeitig jeweils eine deutliche Reduktion der Häufigkeit höherer Verzweigungsordnungen des Dendritenbaumes auf. Die Pyramidenzellen der Schichten II/III des Sensorischen Cortex zeigten im Abp1-KO dagegen eine Abnahme der niedrigen Verzweigungslevel in der Nähe zum Soma (Haag et al. 2012). In Cobl-KO-Mäusen (Pickrodt 2016) nahm die Gesamtzahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle in Schicht II/III des Neocortex ähnlich wie im Sensorischen Cortex des Abp1-KO signifikant ($p < 0,001$) ab. Auch die Gesamtlänge des Dendritenbaumes war signifikant reduziert ($p < 0,001$), während der Verzweigungswinkel signifikant vergrößert ($p < 0,01$) war. In der Analyse nach Sholl zeigten die Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Cobl-KO in einem größeren Bereich (Radii zwischen 10 μm und 85 μm) weniger Schnittpunkte mit den projizierten Ringen. Verglichen mit den Ergebnissen der *loss-of-function*-Experimente zeigten sie jedoch eine signifikante Reduktion der Dendriten erster Ordnung ($p < 0,05$). Zusammenfassend liegt damit nahe, dass das Zusammenspiel von Abp1 und dem Aktinnukleator Cobl auch für die Dendritogenese

corticaler Pyramidenzellen *in vivo* relevant sein könnte. Der Vergleich der KO-Mäuse beider Proteine mit den *in vitro*-Experimenten zeigt eine übereinstimmende Reduktion der dendritischen Verzweigungspunkte, die jedoch in verschiedenen Bereichen des Dendritenbaumes auffällt. Dies könnte darauf hindeuten, dass *in vivo* noch weitere Proteine an diesem Signalweg beteiligt sind und möglicherweise modulierend auf die Maschinerie des dynamischen Aktincytoskeletts wirken könnten. Cobl-like ist beispielsweise ein strukturell mit Cobl verwandtes Protein (Carroll et al. 2003), dessen Funktion im Rahmen der Dendritogenese von primären, hippocampalen Neuronen in Kultur nachweislich von Abp1 abhängig ist (Izadi 2016). Betrachtet man die verschiedenen Arten von Neuronen, die untersucht wurden, könnte sich der Effekt einer Abp1-Defizienz auf die Morphologie der Neurone in verschiedenen Regionen des Gehirns aufgrund ihrer distinkten Funktionen und Ansprüche auch unterschiedlich auswirken. Um dieser Fragestellung nachzugehen, könnten beispielsweise nachfolgend die Purkinje-Zellen der Kleinhirne der Abp1-KO-Mäuse ausgewertet werden.

Der KO von Abp1 hat Auswirkungen auf die Dendritogenese der Pyramidenzellen der Schicht II/III und der Schicht V des Sensorischen Cortex. Um zu adressieren, ob es sich um eine Anpassungsstörung der Neurone der Abp1-KO-Mäuse handeln könnte, könnten corticale Pyramidenzellen jüngerer Abp1-KO-Mäuse untersucht werden. Inwiefern der Effekt abhängig von der Funktion und Lokalisation des Neurons im gesamten neuronalen Netzwerks ist, könnte durch Untersuchungen von Purkinje-Zellen oder Pyramidenzellen des Hippocampus hinsichtlich der Morphologie ihrer Dendritenbäume anhand derselben in dieser Arbeit verwendeten Parameter in Abp1-KO-Mäusen adressiert werden.

6.3 Ist die Integrität des neuronalen Netzwerks unter Abp1-KO beeinflusst?

Schlussendlich bleibt die Frage, inwiefern die durch den Abp1-KO beobachtete verringerte dendritische Komplexität im Cortex und die erniedrigte Zahl dendritischer Dornfortsätze in der CA1 Region des Hippocampus die Integrität des gesamten neuronalen Netzwerks beeinflussen. Die Plastizität des neuronalen Netzwerks bedeutet, dass sich Neurone an die Anforderungen der Umwelt anpassen können. Die Morphologie der Dendritenbäume sowie ihre Dornfortsätze, die als morphologische Basis der strukturellen Plastizität gehandelt werden (Yuste und Urban 2004, Sala und Segal 2014, Matus 2000, Matus 1999, Hering und Sheng 2001, Harris 1999, Bosch und Hayashi 2012, Alvarez und Sabatini 2007), sind sowohl Voraussetzung als auch Folge der neuronalen Anpassungsfähigkeit (Lefebvre et al. 2015, Maletic-Savatic et al. 1999). Die Ergebnisse der Strukturanalysen dieser Arbeit weisen daraufhin, dass die strukturelle Basis der Plastizität unter Abp1-KO morphologisch verändert ist.

Vor allem die pilzförmigen Dornen, die den Großteil der exzitatorischen Postsynapsen des ZNS tragen (Penzes et al. 2011, Hering und Sheng 2001, Bosch und Hayashi 2012, Wefelmeyer et al. 2016, Chen et al. 2014), waren im Hippocampus des Abp1-KO reduziert. Konsequenz einer reduzierten Dornfortsatzdichte könnte eine reduzierte Menge an Synapsen im Abp1-KO sein. In kultivierten hippocampalen Rattenneuronen bewirkte der *knockdown* von Abp1 neben den veränderten Häufigkeiten der Morphologieklassen auch eine Abnahme der Dichte der Synapsen, während die Überexpression von Abp1 analog zu einer Zunahme der Dichte der Synapsen führte (Haeckel et al. 2008). Auch in noch nicht publizierten Versuchen von Dr. Nicole Koch, Institut für Biochemie I des UKJ, konnte in Untersuchungen von exzitatorischen Synapsen mittels Immunfluoreszenzfärbung tatsächlich gezeigt werden, dass in hippocampalen Mauskulturen des Abp1-KO eine geringere Anzahl an PSD95-positiven Punkten pro Strecke des Dendriten im Vergleich zum WT zu finden ist. Ähnliches wurde auch durch den *knockdown* von N-WASP in kultivierten hippocampalen Rattenneuronen nachgewiesen, in denen die Dichte der Synapsen um etwa ein Viertel abnahm (Wegner et al. 2008). Mit weniger synaptischen Kontakten zwischen den einzelnen Zellen, an denen die Signaltransmission stattfinden kann, könnte auch das postsynaptische Potential, das nachfolgend zum Axonhügel fortgeleitet wird, reduziert sein. Folglich könnte das neuronale Netzwerk des Abp1-KO eventuell weniger Informationen weiterleiten und verarbeiten, sodass die Integrität im

gesamten System herabgesetzt sein könnte. Man könnte weiterhin postulieren, dass die Anpassungsfähigkeit der Neurone der CA1 Region des Hippocampus an einen gesteigerten oder verringerten Informationsfluss im Abp1-KO durch Störungen des Aktincytoskeletts verändert sein könnte. Interessant wäre es daher, LTP und LTD in Abp1-KO-Mäusen zu untersuchen. Man würde vermuten, dass die Fähigkeit der dendritischen Dornfortsätze zur Ausbildung von LTP und LTD im Abp1-KO verändert ist. Für das Tier als Individuum könnte dies nun bedeuten, dass bestimmte motorische und/oder sensorische Informationen schlechter prozessiert werden könnten und dies so zu möglichen phänotypischen Auffälligkeiten des Abp1-KO gegenüber dem WT führen könnte. Tatsächlich zeigten die Untersuchungen von Connert et al. (2006) solche Auffälligkeiten. Ein Teil der Abp1-KO-Mäuse zeigte verglichen zu WT-Mäusen im jungen Erwachsenenalter bereits eine Teilparese der Hinterbeine, Muskelkrämpfe und eine gestörte Koordination der Feinmotorik. Der Schwanz-Suspensionstest wies ebenfalls auf ein verändertes Verhalten der Abp1-KO-Mäuse hin. Während die WT-Mäuse ihre Extremitäten ausstreckten, reagierten die Abp1-KO-Mäuse im Rahmen des Tests mit einem Verschränken ihrer Extremitäten. Untersuchungen höherer Hirnfunktionen wurden anhand des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Morris 1989) untersucht. Verglichen mit dem WT verhielten sich die Abp1-KO-Mäuse desorientiert und waren in der Fähigkeit zu schwimmen so eingeschränkt, dass der Test abgebrochen wurde. Um die Fragestellung einer gestörten Informationsübertragung ausführlich und valide adressieren zu können, wären künftig umfassende elektrophysiologische Untersuchungen des Abp1-KO nötig.

Im Rahmen klinischer Forschungen konnte bei einer Vielzahl an Erkrankungen wie beispielsweise Schizophrenie, ASD oder Alzheimer nachweislich eine veränderte Plastizität durch veränderte Morphologie der Dornfortsätze und veränderte Morphologie der Neurone und ihrer Dendritenbäume entdeckt werden (Penzes et al. 2011, Yuste und Urban 2004, Sala und Segal 2014, Fiala et al. 2002, Selemon und Goldman-Rakic 1999). Die Regulation des dynamischen Aktincytoskeletts unter anderem durch Abp1 oder seine Interaktionspartner könnte dabei ursächlich sein. Ein Fehlen des Arp2/3-Komplexes führte bei Mäusen beispielsweise zu reduzierter Dornfortsatzdichte im Cortex und Schizophrenie-ähnlicher Dopaminüberproduktion in Cortex und Mittelhirn, die auf Behandlung mit dem klassischen Antipsychotikum Haloperidol ansprach (Kim et al. 2015). Kopienzahlvariationen sind ein mit ASD

assoziiertes genetisches Phänomen, das im Rahmen von Screenings erkrankter Personen im Cobl-Gen entdeckt wurde und zu Störungen der Neuromorphogenese führte (Griswold et al. 2012). Verschiedene genetische Untersuchungen Schizophrenie- und ASD-erkrankter Patienten konnten Mutationen von Proteinen der ProSAP/Shank-Familie wie beispielsweise Shank3 nachweisen (Moessner et al. 2007, Durand et al. 2007, Grabrucker et al. 2011, Gauthier et al. 2010). Man geht davon aus, dass eine Störung der Funktion von ProSAP/Shank zu Defiziten in der Ausbildung der Struktur der Synapse sowie zu einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Kontakten an der Postsynapse führen kann (Grabrucker et al. 2011). Nachweislich sind veränderte Expressionslevel Aktin-regulierender Proteine wie beispielsweise Abp1 oder Cortactin assoziiert mit einer Shank3-Defizienz (Haeckel et al. 2008, Durand et al. 2012, Duffney et al. 2015, Lin et al. 2016). Diese Erkenntnisse könnten Hinweis darauf geben, dass Aktin-regulierende Proteine wie Abp1 in ihrer Expression und/oder Funktion im Rahmen neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Schizophrenie oder ASD verändert sein könnten oder sogar an der Genese neuropsychiatrischer Erkrankungen beteiligt sein könnten. Untersuchungen weiterer intrazellulärer Strukturen und Mechanismen der Neurone des ZNS könnten künftig dabei helfen, Ursachen für makroskopische Pathologien und neuropsychiatrische Krankheitsbilder zu liefern.

7 Schlussfolgerungen

Das ZNS ist extrem komplex aufgebaut. Viele Aspekte seiner Struktur und Funktion sind uns bis heute nicht bekannt.

Die Struktur der Neurone ist für ihre Funktion ausschlaggebend. Die Dendritenbäume der Pyramidenzellen sowie ihre Synapsen scheinen eine bedeutende Rolle für die Integrität des neuronalen Netzwerks darzustellen. Die exzitatorischen Postsynapsen im ZNS liegen dabei größtenteils auf dendritischen Dornfortsätzen. Die Morphologie der Dendriten und ihrer Dornfortsätze wird durch das dynamische Aktincytoskelett bestimmt. Ein Spieler der komplexen cytoskelettalen Maschinerie der Neurone ist Abp1, das selbst F-Aktin binden und indirekt die Aktinnukleation aktivieren kann.

Abp1-KO-Mäuse besitzen im Vergleich zum WT weniger komplexe und verkürzte Dendritenbäume der Schichten II/III und V des Sensorischen Cortex und weniger dendritische Dornfortsätze in der CA1 Region des Hippocampus. Diese Dornfortsätze sind mit Ausnahme der stummelförmigen Dornen verkürzt. Die pilzförmigen Dornen haben einen reduzierten Kopfdurchmesser sowie analog der dünnen Dornen ein reduziertes Kopfvolumen. Morphologisch weist das neuronale Netzwerk der Abp1-KO-Mäuse erhebliche Auffälligkeiten auf.

Eine eindeutige Aussage, ob Abp1 die Integrität des neuronalen Netzwerks beeinflusst, kann anschließend nicht gemacht werden. Es kann jedoch geschlussfolgert werden, dass Abp1 die Strukturgebung der Neurone und damit möglicherweise auch ihre Funktion beeinflusst. Die Abp1-Defizienz der Abp1-KO-Mäuse könnte folglich zu nachweisbaren Funktionsstörungen auf zellulärer Ebene im neuronalen Netzwerk führen. Um diese These zu adressieren, sollten weitere elektrophysiologische Untersuchungen wie Messungen von LTP und LTD an den Synapsen der Dornfortsätze sowie Analysen der intrazellulären Signalweiterleitung durch Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durchgeführt werden.

Die erhobenen Ergebnisse können zukünftig die Vorlage für weitere cytoskelettale Untersuchungen der Dendritenbäume und ihrer Dornfortsätze in Cortex oder Hippocampus sowie Grundlage für ergänzende elektrophysiologischen Untersuchungen der Synapsen liefern. Die Rolle von Abp1 in der Ausbildung neuronaler Netzwerk-Integrität könnte damit im Rahmen medizinischer Forschung weiter untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

- Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B. 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131 (2):337-350.
- Alvarez VA, Sabatini BL. 2007. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, 30:79-97.
- Amaral D, Lavenex P. 2007. Hippocampal Neuroanatomy. In: Andersen PMRA, D.; Bliss, TVP.; O'Keefe J., Hrsg. *The hippocampus book*. Oxford; New York; Auckland; Cape Town; Dar es Salaam; Hong Kong; Karachi; Kuala Lumpur; Madrid; Melbourne; Mexico City; Nairobi; New Delhi; Shanghai; Taipei; Toronto: Oxford University Press, 37-114.
- Attardo A, Fitzgerald JE, Schnitzer MJ. 2015. Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. *Nature*, 523 (7562):592-596.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. 1997. Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol*, 7 (3):419-429.
- Bosch M, Hayashi Y. 2012. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 22 (3):383-388.
- Bourgeois JP. 2005. [Brain synaptogenesis and epigenesis]. *Med Sci (Paris)*, 21 (4):428-433.
- Bredt DS, Nicoll RA. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron*, 40 (2):361-379.
- Brodmann K. 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde*. Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag.
- Brooks ER, Wallingford JB. 2014. Multiciliated cells. *Curr Biol*, 24 (19):R973-982.
- Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, Berg E, Beier DR, Copp AJ, Klingensmith J. 2003. Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev Biol*, 262 (1):16-31.
- Chen CC, Lu J, Zuo Y. 2014. Spatiotemporal dynamics of dendritic spines in the living brain. *Front Neuroanat*, 8:28.
- Chicurel ME, Harris KM. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 325 (2):169-182.
- Chklovskii DB. 2004. Synaptic connectivity and neuronal morphology: two sides of the same coin. *Neuron*, 43 (5):609-617.
- Connert S, Wienand S, Thiel C, Krikunova M, Glyvuk N, Tsytsyura Y, Hilfiker-Kleiner D, Bartsch JW, Klingauf J, Wienands J. 2006. SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioral abnormalities and impaired vesicle transport. *EMBO J*, 25 (8):1611-1622.
- Dahl JP, Wang-Dunlop J, Gonzales C, Goad ME, Mark RJ, Kwak SP. 2003. Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci*, 23 (8):3343-3352.
- Dominguez R. 2010. Structural insights into de novo actin polymerization. *Curr Opin Struct Biol*, 20 (2):217-225.

- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 83 (2):433-473.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8 (4):1454-1468.
- Drubin DG, Miller KG, Botstein D. 1988. Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol*, 107 (6 Pt 2):2551-2561.
- Duffney LJ, Zhong P, Wei J, Matas E, Cheng J, Qin L, Ma K, Dietz DM, Kajiwar Y, Buxbaum JD, Yan Z. 2015. Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep*, 11 (9):1400-1413.
- Durand CM, Perroy J, Loll F, Perrais D, Fagni L, Bourgeron T, Montcouquiol M, Sans N. 2012. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol Psychiatry*, 17 (1):71-84.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*, 39 (1):25-27.
- Feldmeyer D. 2012. Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat*, 6:24.
- Fenster SD, Kessels MM, Qualmann B, Chung WJ, Nash J, Gundelfinger ED, Garner CC. 2003. Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones. *J Biol Chem*, 278 (22):20268-20277.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM. 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 39 (1):29-54.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*, 18 (21):8900-8911.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20 (5):847-854.
- Gauthier J, Champagne N, Lafreniere RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, Lapointe M, Peng H, Cote M, Noreau A, Hamdan FF, Addington AM, Rapoport JL, Delisi LE, Krebs MO, Joober R, Fathalli F, Mouaffak F, Haghighi AP, Neri C, Dube MP, Samuels ME, Marineau C, Stone EA, Awadalla P, Barker PA, Carbonetto S, Drapeau P, Rouleau GA, Team SD. 2010. De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (17):7863-7868.
- Georges PC, Hadzimichalis NM, Sweet ES, Firestein BL. 2008. The yin-yang of dendrite morphology: unity of actin and microtubules. *Mol Neurobiol*, 38 (3):270-284.
- Glaser EM, Van der Loos H. 1981. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods*, 4 (2):117-125.

- Goley ED, Welch MD. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (10):713-726.
- Grabrucker AM, Schmeisser MJ, Schoen M, Boeckers TM. 2011. Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends Cell Biol*, 21 (10):594-603.
- Gray EG. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature*, 183 (4675):1592-1593.
- Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, Chung RH, Jaworski JM, Salyakina D, Konidari I, Whitehead PL, Wright HH, Abramson RK, Williams SM, Menon R, Martin ER, Haines JL, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. 2012. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet*, 21 (15):3513-3523.
- Haag N, Schwintzer L, Ahuja R, Koch N, Grimm J, Heuer H, Qualmann B, Kessels MM. 2012. The actin nucleator Cobl is crucial for Purkinje cell development and works in close conjunction with the F-actin binding protein Abp1. *J Neurosci*, 32 (49):17842-17856.
- Haeckel A, Ahuja R, Gundelfinger ED, Qualmann B, Kessels MM. 2008. The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation. *J Neurosci*, 28 (40):10031-10044.
- Harris KM. 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 9 (3):343-348.
- Harris KM, Stevens JK. 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci*, 9 (8):2982-2997.
- Harris KM, Kater SB. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 17:341-371.
- Hering H, Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2 (12):880-888.
- Hering H, Sheng M. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci*, 23 (37):11759-11769.
- Holmes KC. 2009. Structural biology: actin in a twist. *Nature*, 457 (7228):389-390.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347 (6288):44-49.
- Holtmaat A, Caroni P. 2016. Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nat Neurosci*, 19 (12):1553-1562.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A. 2010. Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *Neuroscientist*, 16 (6):650-661.
- Hou W, Izadi M, Nemitz S, Haag N, Kessels MM, Qualmann B. 2015. The Actin Nucleator Cobl Is Controlled by Calcium and Calmodulin. *PLoS Biol*, 13 (9):e1002233.
- Hutsler JJ, Zhang H. 2010. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res*, 1309:83-94.

- Iasevoli F, Tomasetti C, de Bartolomeis A. 2013. Scaffolding proteins of the post-synaptic density contribute to synaptic plasticity by regulating receptor localization and distribution: relevance for neuropsychiatric diseases. *Neurochem Res*, 38 (1):1-22.
- Izadi M. 2016. Identification and characterization of interactions and functions of the actin nucleator Cobl and its relative Cobl-like [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Jain N, Lim LW, Tan WT, George B, Makeyev E, Thanabalu T. 2014. Conditional N-WASP knockout in mouse brain implicates actin cytoskeleton regulation in hydrocephalus pathology. *Exp Neurol*, 254:29-40.
- Jan YN, Jan LY. 2010. Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci*, 11 (5):316-328.
- Kaeck S, Fischer M, Doll T, Matus A. 1997. Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *J Neurosci*, 17 (24):9565-9572.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003a. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26 (7):360-368.
- Kasai T, Yamada M, Narushima M, Suzuki H. 2003b. [Relationship between thoracic cross-sectional area measured on CT and pulmonary function or dyspnea in patients with COPD]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 41 (8):526-530.
- Kennedy MB. 2000. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, 290 (5492):750-754.
- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG. 2000. Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell*, 11 (1):393-412.
- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG, Qualmann B. 2001. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol*, 153 (2):351-366.
- Kessels MM, Schwintzer L, Schlobinski D, Qualmann B. 2011. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, 90 (11):926-933.
- Kim IH, Rossi MA, Aryal DK, Racz B, Kim N, Uezu A, Wang F, Wetsel WC, Weinberg RJ, Yin H, Soderling SH. 2015. Spine pruning drives antipsychotic-sensitive locomotion via circuit control of striatal dopamine. *Nat Neurosci*, 18 (6):883-891.
- Kirkpatrick LL, Brady ST. 1999. *Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton* Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Koch N, Kobler O, Thomas U, Qualmann B, Kessels MM. 2014. Terminal axonal arborization and synaptic bouton formation critically rely on abp1 and the arp2/3 complex. *PLoS One*, 9 (5):e97692.
- Koch N, Dharmalingam E, Westermann M, Qualmann B, Thomas U, Kessels MM. 2012. Abp1 utilizes the Arp2/3 complex activator Scar/WAVE in bristle development. *J Cell Sci*, 125 (Pt 15):3578-3589.
- Konietzny A, Bar J, Mikhaylova M. 2017. Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Front Cell Neurosci*, 11:147.

- Korobova F, Svitkina T. 2008. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell*, 19 (4):1561-1574.
- Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG. 1998. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell*, 9 (8):1951-1959.
- Larbolette O, Wollscheid B, Schweikert J, Nielsen PJ, Wienands J. 1999. SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol Cell Biol*, 19 (2):1539-1546.
- Lee SH, Dominguez R. 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells*, 29 (4):311-325.
- Lefebvre JL, Sanes JR, Kay JN. 2015. Development of dendritic form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 31:741-777.
- Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E, McConnell SK. 2008. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 18 (1):28-35.
- Lian G, Sheen VL. 2015. Cytoskeletal proteins in cortical development and disease: actin associated proteins in periventricular heterotopia. *Front Cell Neurosci*, 9:99.
- Lin WH, Webb DJ. 2009. Actin and Actin-Binding Proteins: Masters of Dendritic Spine Formation, Morphology, and Function. *Open Neurosci J*, 3:54-66.
- Lin YC, Frei JA, Kilander MB, Shen W, Blatt GJ. 2016. A Subset of Autism-Associated Genes Regulate the Structural Stability of Neurons. *Front Cell Neurosci*, 10:263.
- Lock P, Abram CL, Gibson T, Courtneidge SA. 1998. A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *EMBO J*, 17 (15):4346-4357.
- Lussier MP, Sanz-Clemente A, Roche KW. 2015. Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *J Biol Chem*, 290 (48):28596-28603.
- Machesky L, Insall R. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8:1347-1356.
- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, 127 (1):107-115.
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44 (1):5-21.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, 283 (5409):1923-1927.
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 25:103-126.
- Matus A. 1999. Postsynaptic actin and neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 9 (5):561-565.
- Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 290 (5492):754-758.
- Matus A, Brinkhaus H, Wagner U. 2000. Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus*, 10 (5):555-560.

- Miller M, Peters A. 1981. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol*, 203 (4):555-573.
- Miller MW. 1986. Maturation of rat visual cortex. III. Postnatal morphogenesis and synaptogenesis of local circuit neurons. *Brain Res*, 390 (2):271-285.
- Miller MW. 1988. Maturation of rat visual cortex: IV. The generation, migration, morphogenesis, and connectivity of atypically oriented pyramidal neurons. *J Comp Neurol*, 274 (3):387-405.
- Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. 2007. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*, 81 (6):1289-1297.
- Morris RG. 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci*, 9 (9):3040-3057.
- Moyer CE, Shelton MA, Sweet RA. 2015. Dendritic spine alterations in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 601:46-53.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (11):6181-6186.
- Niesmann K, Breuer D, Brockhaus J, Born G, Wolff I, Reissner C, Kilimann MW, Rohlmann A, Missler M. 2011. Dendritic spine formation and synaptic function require neurobeachin. *Nat Commun*, 2:557.
- Palay SL, Palade GE. 1955. The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol*, 1 (1):69-88.
- Papa M, Bundman MC, Greenberger V, Segal M. 1995. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 15 (1 Pt 1):1-11.
- Parker D. 2010. Neuronal network analyses: premises, promises and uncertainties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365 (1551):2315-2328.
- Parnass Z, Tashiro A, Yuste R. 2000. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, 10 (5):561-568.
- Pascual-Leone A, Freitas C, Oberman L, Horvath JC, Halko M, Eldaief M, Bashir S, Vernet M, Shafi M, Westover B, Vahabzadeh-Hagh AM, Rotenberg A. 2011. Characterizing brain cortical plasticity and network dynamics across the age-span in health and disease with TMS-EEG and TMS-fMRI. *Brain Topogr*, 24 (3-4):302-315.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14 (3):285-293.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat*, 127 (4):321-355.
- Pickrodt K. 2016. Konsequenzen einer Cobl-Defizienz für die strukturelle Organisation des murinen Neocortex in vivo [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Pinyol R, Haeckel A, Ritter A, Qualmann B, Kessels MM. 2007. Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PLoS One*, 2 (5):e400.

- Pollard TD. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36:451-477.
- Pollard TD, Cooper JA. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, 55:987-1035.
- Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112 (4):453-465.
- Qualmann B, Kessels MM. 2009. New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol*, 19 (6):276-285.
- Qualmann B, Boeckers TM, Jeromin M, Gundelfinger ED, Kessels MM. 2004. Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci*, 24 (10):2481-2495.
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD. 2005. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433 (7024):382-388.
- Ramon y Cajal S. 1888. Estructura des los centros nerviosos de las aves *Rev. Trim Histol Norm Pat*, 1:1-10.
- Reth M, Wienands J. 1997. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*, 15:453-479.
- Roberts RC, Conley R, Kung L, Peretti FJ, Chute DJ. 1996. Reduced striatal spine size in schizophrenia: a postmortem ultrastructural study. *Neuroreport*, 7 (6):1214-1218.
- Sabatini M, Thomas M, Deschamps C, Lesur C, Rolland G, de Nanteuil G, Bonnet J. 2001. Effects of ceramide on aggrecanase activity in rabbit articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 283 (5):1105-1110.
- Sainath R, Gallo G. 2015. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell Tissue Res*, 359 (1):267-278.
- Sala C, Segal M. 2014. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, 94 (1):141-188.
- Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, 31 (1):115-130.
- Schneider K. 2014. Charakterisierung postsynaptischer Funktionen des F-BAR-Domänenproteins Syndapin I [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS. 1999. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 45 (1):17-25.
- Sever S, Damke H, Schmid SL. 2000. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic*, 1 (5):385-392.
- Sheng M, Kim E. 2000. The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci*, 113 (Pt 11):1851-1856.
- Sheng M, Hoogenraad CC. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 76:823-847.
- Sholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87 (4):387-406.

- Soderling SH, Guire ES, Kaech S, White J, Zhang F, Schutz K, Langeberg LK, Banker G, Raber J, Scott JD. 2007. A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci*, 27 (2):355-365.
- Sorra KE, Harris KM. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10 (5):501-511.
- Spacek J. 1985. Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol (Berl)*, 171 (2):235-243.
- Spacek J, Harris KM. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci*, 17 (1):190-203.
- Sparks AB, Hoffman NG, McConnell SJ, Fowlkes DM, Kay BK. 1996. Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat Biotechnol*, 14 (6):741-744.
- Spence EF, Kanak DJ, Carlson BR, Soderling SH. 2016. The Arp2/3 Complex Is Essential for Distinct Stages of Spine Synapse Maturation, Including Synapse Unsilencing. *J Neurosci*, 36 (37):9696-9709.
- Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. 2003. *Fundamental neuroscience*. Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5 (3):239-246.
- Strasser GA, Rahim NA, VanderWaal KE, Gertler FB, Lanier LM. 2004. Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation. *Neuron*, 43 (1):81-94.
- Svitkina TM. 2013. Ultrastructure of protrusive actin filament arrays. *Curr Opin Cell Biol*, 25 (5):574-581.
- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 160 (3):409-421.
- Takenawa T, Miki H. 2001. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, 114 (Pt 10):1801-1809.
- Urano T, Liu J, Zhang P, Fan Y, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X. 2001. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*, 3 (3):259-266.
- Vaughn JE. 1989. Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse*, 3 (3):255-285.
- Veltman DM, King JS, Machesky LM, Insall RH. 2012. SCAR knockouts in Dictyostelium: WASP assumes SCAR's position and upstream regulators in pseudopods. *J Cell Biol*, 198 (4):501-508.
- Vessey JP, Karra D. 2007. More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *J Neurochem*, 102 (2):324-332.
- Walmsley B, Alvarez FJ, Fyffe RE. 1998. Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Trends Neurosci*, 21 (2):81-88.

- Walsh DM, Selkoe DJ. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 44 (1):181-193.
- Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA. 2001. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, 11 (5):370-374.
- Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, Parsons JT. 2000. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 151 (1):29-40.
- Wefelmeyer W, Puhl CJ, Burrone J. 2016. Homeostatic Plasticity of Subcellular Neuronal Structures: From Inputs to Outputs. *Trends Neurosci*, 39 (10):656-667.
- Wegner A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108 (1):139-150.
- Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ. 2008. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*, 283 (23):15912-15920.
- Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ. 1997. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*, 138 (2):375-384.
- Welsch U, Deller T. 2010. *Lehrbuch Histologie*. 4 Aufl. München: Urban&Fischer/Elsevier GmbH.
- Wu H, Parsons JT. 1993. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol*, 120 (6):1417-1426.
- Yamazaki H, Takahashi H, Aoki T, Shirao T. 2001. Molecular cloning and dendritic localization of rat SH3P7. *Eur J Neurosci*, 14 (6):998-1008.
- Yuste R. 2010. *Dendritic Spines*. Cambridge, (MA): MIT Press.
- Yuste R, Bonhoeffer T. 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 24:1071-1089.
- Yuste R, Urban R. 2004. Dendritic spines and linear networks. *J Physiol Paris*, 98 (4-6):479-486.
- Zalevsky J, Lempert L, Kranitz H, Mullins RD. 2001. Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr Biol*, 11 (24):1903-1913.
- Ziv NE, Smith SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17 (1):91-102.

9 Anhang

9.1 Statistische Daten

9.1.1 Darstellung statistischer Details der Analyse dendritischer Dornfortsätze der Region CA1 des Hippocampus

Tabelle 5 zeigt die in Abbildung 12, E-I des Ergebnisteils dargestellte Auswertung der Dornfortsatzdichten. Tabelle 6 zeigt die in Abbildung 12, J dargestellte prozentuale Verteilung der Morphologieklassen.

Tabelle 5 Statistische Details der Dornfortsatzdichten von WT und Abp1-KO Angegeben sind die Mittelwerte, SD und SEM pro 10 µm Dendrit.

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Dornfortsatzdichte	WT	10,976	2,587	0,271	91	<0,0001
	KO	7,421	1,731	0,182	90	
Dichte stummelförmiger Dornen	WT	1,225	0,688	0,072	91	0,2351
	KO	1,082	0,550	0,072	90	
Dichte pilzförmiger Dornen	WT	5,447	1,650	0,173	91	<0,0001
	KO	3,505	0,947	0,100	90	
Dichte dünnere Dornen	WT	2,474	1,133	0,119	91	<0,0001
	KO	1,821	0,674	0,071	90	
Dichte filopodienähnlicher Dornen	WT	1,808	0,989	0,104	91	<0,0001
	KO	0,994	0,533	0,056	90	

Tabelle 6 Prozentuale Anteile der einzelnen Morphologieklassen an der Dornfortsatzdichte von WT und Abp1-KO Angegeben sind die Mittelwerte, SD und SEM in %.

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Anteil stummelförmiger Dornen	WT	11,45	6,55	0,687	91	0,0013
	KO	14,78	7,16	0,755	90	
Anteil pilzförmiger Dornen	WT	49,79	9,62	1,009	91	0,1153
	KO	47,60	8,98	0,946	90	
Anteil dünnere Dornen	WT	22,91	8,88	0,931	91	0,1603
	KO	24,57	6,76	0,712	90	
Anteil filopodienähnlicher Dornen	WT	15,84	6,54	0,686	91	0,0023
	KO	13,05	5,56	0,590	90	

Tabelle 7 zeigt die in Abbildung 13, A-C des Ergebnisteils dargestellten Werte der Kopfweiten der Dornfortsätze.

Tabelle 7 Statistische Details der Kopfweiten der Dornfortsätze von WT und Abp1-KO
Angabe sind die Mittelwerte, SD und SEM in μm .

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Kopfweite stummel- förmiger, pilzförmiger und dünner Dornen	WT	0,519	0,176	0,002	6960	0,2037
	KO	0,496	0,169	0,002	5192	
Kopfweite stummel- förmiger Dornen	WT	0,524	0,173	0,006	945	0,2093
	KO	0,514	0,167	0,006	882	
Kopfweite pilzförmiger Dornen	WT	0,599	0,149	0,002	4169	<0,0001
	KO	0,575	0,148	0,003	2823	
Kopfweite dünner Dornen	WT	0,338	0,061	0,001	1846	0,1318
	KO	0,335	0,062	0,002	1487	

Tabelle 8 zeigt die in Abbildung 13, D-F des Ergebnisteils dargestellten Werte des Kopfvolumens.

Tabelle 8 Statistische Details der Kopfvolumina der Dornfortsätze von WT und Abp1-KO
Angabe sind die Mittelwerte, SD und SEM in μm^3 .

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Kopfvolumen stummel- förmiger, pilzförmiger und dünner Dornen	WT	0,146	0,025	0,008	6960	0,1709
	KO	0,132	0,021	0,007	5192	
Kopfvolumen stummelförmiger Dornen	WT	0,124	0,116	0,004	945	0,6022
	KO	0,121	0,104	0,003	882	
Kopfvolumen pilzförmiger Dornen	WT	0,163	0,112	0,002	4169	<0,0001
	KO	0,156	0,115	0,002	2823	
Kopfvolumen dünner Dornen	WT	0,150	0,123	0,003	1846	<0,0001
	KO	0,117	0,099	0,003	1487	

Tabelle 9 zeigt die in Abbildung 13, G-J des Ergebnisteils dargestellten Werte der Dornfortsatzlängen.

Tabelle 9 Statistische Details der Dornfortsatzlängen von WT und Abp1-KO Angegeben sind die Mittelwerte, SD und SEM in μm .

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Gesamtdornfortsatzlänge	WT	1,456	0,681	0,007	8396	0,0355
	KO	1,302	0,625	0,008	5982	
Länge stummelförmiger Dornen	WT	0,590	0,126	0,004	945	0,1013
	KO	0,597	0,126	0,004	882	
Länge pilzförmiger Dornen	WT	1,539	0,637	0,010	4169	<0,0001
	KO	1,405	0,573	0,010	2823	
Länge dünnere Dornen	WT	1,587	0,649	0,151	1846	<0,0001
	KO	1,440	0,606	0,157	1487	
Länge filopodien-ähnlicher Dornen	WT	1,614	0,647	0,171	1436	<0,0001
	KO	1,461	0,652	0,023	790	

9.1.2 Detaillierte Darstellung und statistische Details der Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex

Tabelle 10 zeigt statistische Details der in Abbildung 16 des Ergebnisteils dargestellten Analyse nach Sholl in der Schicht II/III des Sensorischen Cortex.

Tabelle 10 Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO nach Sholl Ausgewertet wurden Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex von jeweils drei 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen (WT n=92 und KO n=92). MW: Mittelwert.

Abstand vom Startpunkt [µm]	Schnittpunkt-zahl WT		Schnittpunkt-zahl KO		Differenz der MW	95 % CI	p-Wert
	MW	SEM	MW	SEM			
10	5,141	0,197	4,174	0,149	0,967	0,044 bis 1,891	0,0312
15	5,793	0,219	4,630	0,187	1,163	0,239 bis 2,087	0,0029
20	6,489	0,227	5,185	0,212	1,304	0,381 bis 2,228	0,0004
25	6,957	0,243	5,489	0,238	1,467	0,544 bis 2,391	<0,0001
30	7,315	0,248	5,424	0,230	1,891	0,968 bis 2,815	<0,0001
35	7,228	0,232	5,348	0,233	1,880	0,957 bis 2,804	<0,0001
40	6,880	0,218	5,250	0,230	1,630	0,707 bis 2,554	<0,0001
45	6,489	0,277	5,033	0,240	1,457	0,533 bis 2,380	<0,0001
50	6,283	0,266	4,652	0,240	1,630	0,707 bis 2,554	<0,0001
55	6,022	0,260	4,478	0,232	1,543	0,620 bis 2,467	<0,0001
60	5,696	0,263	4,522	0,218	1,174	0,250 bis 2,098	0,0025
65	5,163	0,267	4,261	0,208	0,902	-0,021 bis 1,826	0,0624
70	4,804	0,248	4,022	0,201	0,783	-0,141 bis 1,706	0,1917
75	4,413	0,239	3,815	0,187	0,598	-0,326 bis 1,521	0,6477
80	4,120	0,210	3,478	0,167	0,641	-0,282 bis 1,565	0,5215
85	3,750	0,204	3,272	0,175	0,478	-0,445 bis 1,402	0,9192
90	3,500	0,197	3,163	0,188	0,337	-0,587 bis 1,261	0,9982
95	3,315	0,186	2,935	0,172	0,380	-0,543 bis 1,304	0,9919
100	3,196	0,188	2,739	0,163	0,457	-0,467 bis 1,380	0,9461

Tabelle 11 zeigt statistische Details des Vergleichs der Anzahl der Verzweigungslevel in Abbildung 17, A des Ergebnisteils. Tabelle 12 zeigt statistische Details der absoluten Werte der Auswertung dargestellt in Abbildung 17, B-G.

Tabelle 11 Anzahl der Verzweigungslevel pro Zelle in Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO Ausgewertet wurden Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex von jeweils drei 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen (WT n=92 und KO n=92). MW: Mittelwert.

Verzweigungs- level	Anzahl WT		Anzahl KO		Differenz der MW	95 %CI	p-Wert
	MW	SEM	MW	SEM			
1	11,185	0,361	8,760	0,321	2,424	1,558 bis 3,289	<0,0001
2	10,283	0,422	6,696	0,297	3,587	2,722 bis 4,452	<0,0001
3	4,260	0,429	2,652	0,256	1,609	0,743 bis 2,474	<0,0001
4	1,565	0,277	0,891	0,197	0,674	-0,192 bis 1,539	0,2563
5	0,652	0,176	0,391	0,149	0,261	-0,605 bis 1,126	0,9938
6	0,315	0,123	0,196	0,087	0,120	-0,746 bis 0,985	>0,9999
7	0,185	0,067	0,076	0,038	0,109	-0,757 bis 0,974	>0,9999
8	0,130	0,053	0,011	0,010	0,120	-0,746 bis 0,985	>0,9999
9	0,087	0,050	0	0	0,087	-0,779 bis 0,952	>0,9999
10	0,011	0,011	0	0	0,011	-0,855 bis 0,876	>0,9999

Tabelle 12 Statistische Details der Dendritenbaumanalyse aus Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO Analysiert wurden die Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle, die Länge des Dendritenbaumes [μm], die mittlere Segmentlänge pro Zelle [μm], die Anzahl der Segmente pro Zelle, das Gesamtvolumen des Dendritenbaumes [μm^3] und der mittlere Verzweigungswinkel pro Zelle [$^\circ$].

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Dendritische Verzweigungspunkte pro Zelle	WT	11,74	5,49	0,57	92	<0,0001
	KO	7,71	3,20	0,33	92	
Länge des Dendritenbaumes [μm]	WT	916,03	248,20	25,87	92	<0,0001
	KO	741,29	229,40	23,92	92	
Mittlere Segmentlänge pro Zelle [μm]	WT	34,33	8,22	0,86	92	0,0002
	KO	39,53	10,30	1,08	92	
Anzahl der Segmente pro Zelle	WT	28,07	11,05	1,15	92	<0,0001
	KO	19,65	6,60	0,69	92	
Gesamtvolumen des Dendritenbaumes [μm^3]	WT	10996	9572	998	92	0,0003
	KO	9249	8156	855	92	
Mittlerer Verzweigungswinkel pro Zelle [$^\circ$]	WT	40,17	6,56	0,73	92	0,0025
	KO	43,61	8,26	0,86	92	

9.1.3 Detaillierte Darstellung der Werte und statistische Details der Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex

Tabelle 13 zeigt statistische Details der Analyse nach Sholl in der Schicht V des Sensorischen Cortex dargestellt in Abbildung 18 des Ergebnisteils.

Tabelle 13 Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO nach Sholl Ausgewertet wurden Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex von jeweils drei 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen (WT n=89 und KO n=90). MW: Mittelwert.

Abstand vom Startpunkt [µm]	Schnittpunkt- zahl WT		Schnittpunkt- zahl KO		Differenz der MW	95 % CI	p-Wert
	MW	SEM	MW	SEM			
10	4,539	0,220	4,611	0,199	-0,072	-1,252 bis 1,086	>0,9999
15	5,236	0,258	5,000	0,217	0,236	-0,945 bis 1,416	>0,9999
20	6,079	0,288	5,844	0,252	0,234	-0,946 bis 1,415	>0,9999
25	6,787	0,330	6,378	0,290	0,409	-0,772 bis 1,589	0,9991
30	7,258	0,356	6,578	0,302	0,681	-0,500 bis 1,861	0,8190
35	7,202	0,353	6,344	0,299	0,858	-0,323 bis 2,038	0,4375
40	6,978	0,354	6,089	0,293	0,889	-0,292 bis 2,069	0,3740
45	6,933	0,351	5,844	0,291	1,088	-0,092 bis 2,269	0,1031
50	6,629	0,331	5,544	0,280	1,085	-0,096 bis 2,265	0,1058
55	6,427	0,317	5,322	0,267	1,150	-0,031 bis 2,330	0,0641
60	6,045	0,300	4,967	0,264	1,078	-0,102 bis 2,259	0,1111
65	5,775	0,295	5,056	0,286	0,720	-0,461 bis 1,900	0,7439
70	5,337	0,280	4,811	0,277	0,526	-0,655 bis 1,706	0,9805
75	5,135	0,273	4,656	0,266	0,479	-0,701 bis 1,660	0,9932
80	4,775	0,278	4,389	0,255	0,386	-0,794 bis 1,567	0,9996
85	4,764	0,260	4,122	0,245	0,642	-0,539 bis 1,822	0,8808
90	4,607	0,257	3,811	0,214	0,796	-0,385 bis 1,976	0,5762
95	4,517	0,262	3,589	0,203	0,928	-0,253 bis 2,108	0,3305
100	4,281	0,254	3,511	0,200	0,770	-0,411 bis 1,950	0,6348

Tabelle 14 zeigt statistische Details des Vergleichs der Anzahl der Verzweigungslevel in Abbildung 19, A des Ergebnisteils. Tabelle 15 zeigt statistische Details der absoluten Werte der Auswertung dargestellt in Abbildung 19, B-G.

Tabelle 14 Anzahl der Verzweigungslevel pro Zelle in Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO Ausgewertet wurden Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex von jeweils drei 25 Wochen alten WT und Abp1-KO-Mäusen (WT n=89 und KO n=90). MW: Mittelwert.

Verzweigungs- level	Anzahl WT		Anzahl KO		Differenz der MW	95 % CI	p-Wert
	MW	SEM	MW	SEM			
1	10,620	0,658	11,490	0,418	-0,871	-2,059 bis 0,318	0,3360
2	10,73	0,632	9,856	0,475	0,875	-0,314 bis 2,063	0,3299
3	4,742	0,392	3,233	0,325	1,508	0,320 bis 2,697	0,0038
4	1,843	0,235	0,956	0,196	0,887	-0,301 bis 2,076	0,3109
5	1,258	0,192	0,456	0,176	0,803	-0,386 bis 1,991	0,4524
6	0,976	0,170	0,211	0,109	0,766	-0,422 bis 1,955	0,5204
7	0,730	0,140	0,100	0,057	0,630	-0,558 bis 1,819	0,7716
8	0,798	0,174	0,100	0,059	0,698	-0,491 bis 1,886	0,6514
9	0,584	0,171	0,067	0,038	0,518	-0,671 bis 1,706	0,9191
10	0,427	0,126	0,022	0,016	0,405	-0,784 bis 1,593	0,9843

Tabelle 15 Statistische Details der Dendritenbaumanalyse aus Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO Analysiert wurden die Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle, die Länge des Dendritenbaumes [μm], die mittlere Segmentlänge pro Zelle [μm], die Anzahl der Segmente pro Zelle, das Gesamtvolumen des Dendritenbaumes [μm^3] und der mittlere Verzweigungswinkel pro Zelle [$^\circ$].

		Mittelwert	SD	SEM	n	p-Wert
Dendritische Verzweigungspunkte pro Zelle	WT	14,25	5,84	0,58	89	<0,0001
	KO	10,74	4,61	0,48	90	
Länge des Dendritenbaumes [μm]	WT	1336,87	459,04	48,66	89	0,0011
	KO	1106,69	369,11	38,91	90	
Mittlere Segmentlänge pro Zelle [μm]	WT	40,56	7,01	0,74	89	0,0467
	KO	43,05	8,69	0,91	90	
Anzahl der Segmente pro Zelle	WT	33,60	12,20	1,29	89	<0,0001
	KO	26,48	9,33	0,98	90	
Gesamtvolumen des Dendritenbaumes [μm^3]	WT	465,29	526,95	5,55	89	0,1557
	KO	497,58	759,02	80,91	90	
Mittlerer Verzweigungswinkel pro Zelle [$^\circ$]	WT	44,86	7,92	0,84	89	0,6723
	KO	44,14	7,38	0,78	90	

9.2 Ergänzendes Abbildungsmaterial

9.2.1 Darstellung der prozentualen Abweichungen der Analyse der Dornfortsätze der CA1 Region des Hippocampus

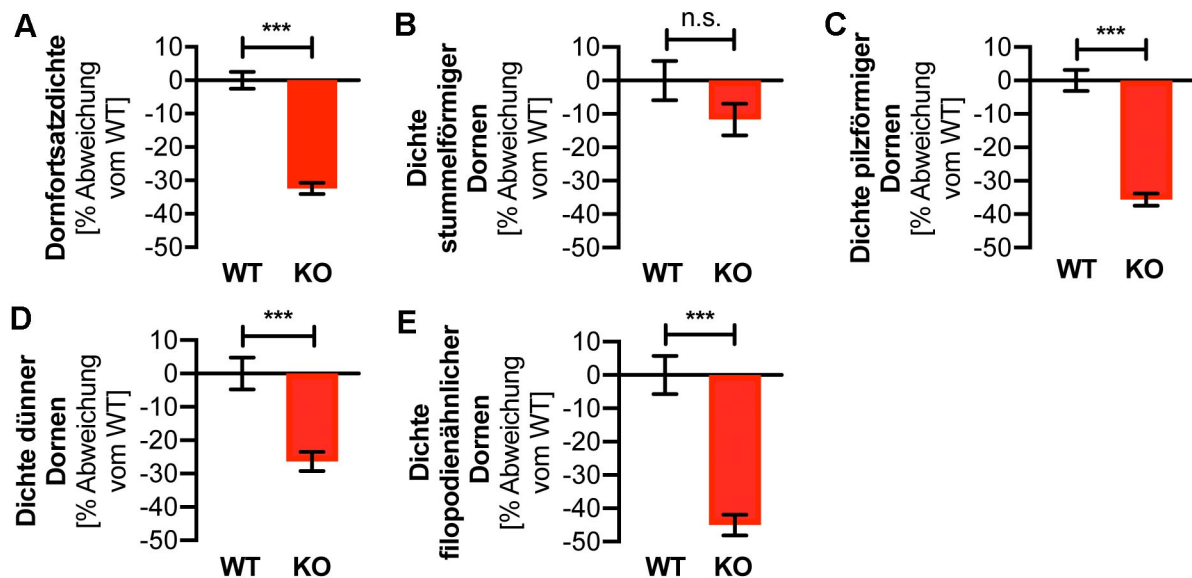


Abbildung 20 Darstellung der relativen Dornfortsatzdichten sowie Dichten einzelner Morphologieklassen von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen

Analysiert wurden analog zu Abbildung 12, E-I des Ergebnisteils die gesamte Dornfortsatzdichte (A), die Dichte stummelförmiger Dornen (B), pilzförmiger Dornen (C), dünner Dornen (D) sowie filopodienähnlicher Dornen (E) an Dendriten von Pyramidenzellen der CA1 Region in jeweils drei WT und drei Abp1-KO-Mäusen. Untersucht wurden insgesamt 91 Dendriten im WT und insgesamt 90 Dendriten im Abp1-KO. Die Parameter wurden auf Signifikanz der prozentualen Abweichung ihrer Mittelwerte vom Mittelwert des WT anhand des ungepaarten, zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test (CI=95%) untersucht.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveaus entsprechen *** für $p < 0,001$, n.s. für nicht signifikante Ergebnisse.

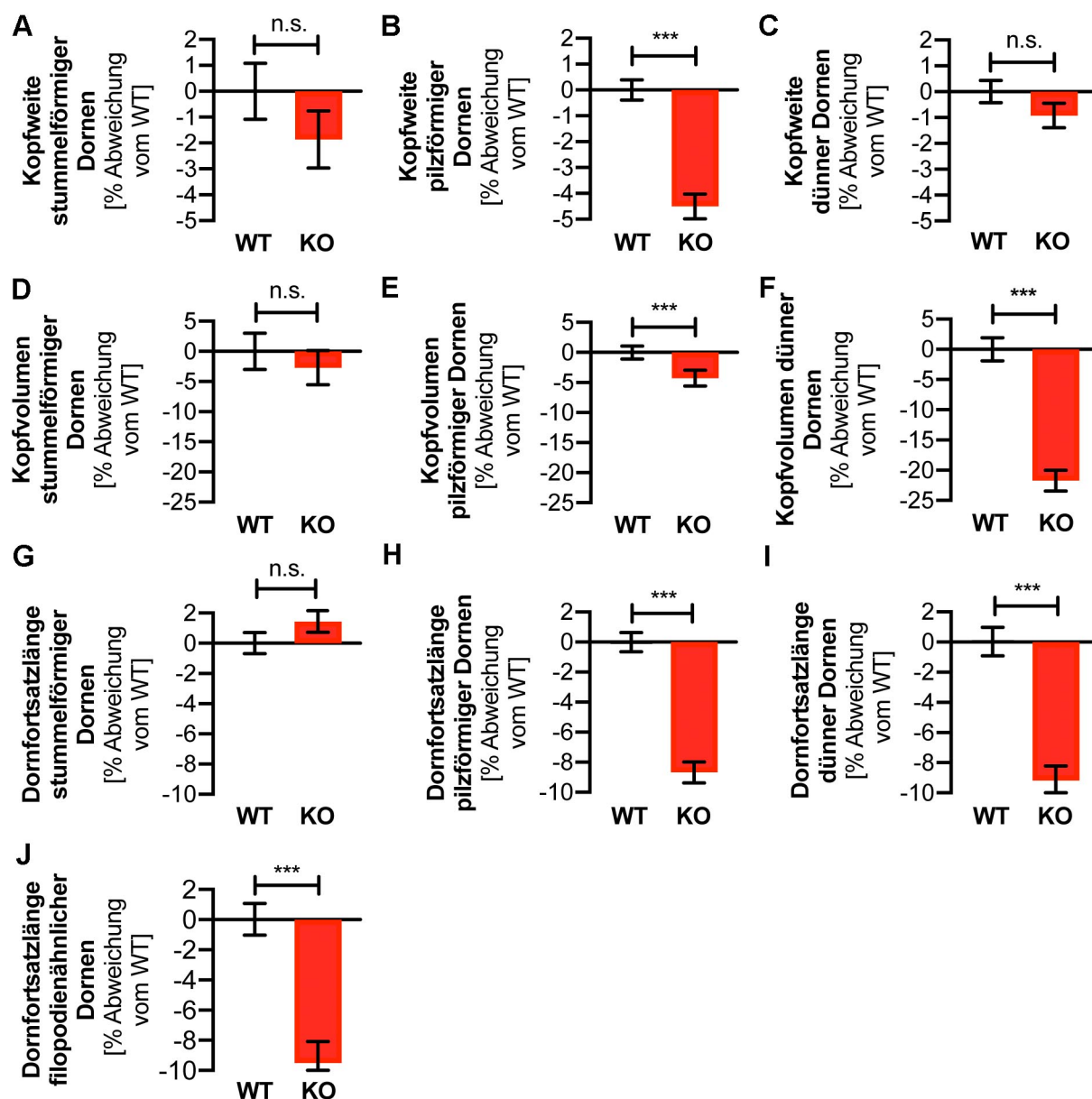


Abbildung 21 Darstellung der relativen Werte spezifischer morphologischer Parameter der Dornfortsätze der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen

Analysiert wurden analog zu Abbildung 13 des Ergebnisteils die Dornfortsätze aller Klassen an Dendriten von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus von WT und Abp1-KO-Mäusen. Untersucht wurden insgesamt 91 Dendriten im WT und insgesamt 90 Dendriten im Abp1-KO. Die Parameter wurden auf Signifikanz der prozentualen Abweichung ihrer Mittelwerte vom Mittelwert des WT anhand des ungepaarten, zweiseitigen *Mann-Whitney*-Tests (CI=95%) untersucht.

A-C Kopfweite stummelförmiger (WT n=945; KO n=882), pilzförmiger (WT n=4169; KO n=2823) und dünner (WT n=1846; KO n=1487) Dornen.

D-F Kopfvolumen stummelförmiger (WT n=945; KO n=882), pilzförmiger Dornen (WT n=4169; KO n=2823) und dünner (WT n=1846; KO n=1487) Dornen.

G-J Dornfortsatzlänge stummelförmiger (WT n=945; KO n=882), pilzförmiger (WT n=4169; KO n=2823), dünner (WT n=1846; KO n=1487) und filopodienähnlicher (WT n=1436; KO n=790) Dornen.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte aller Einzelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveau entspricht *** für $p < 0,001$, n.s. für nicht signifikante Ergebnisse.

9.2.2 Darstellung der prozentualen Abweichungen der Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III und der Schicht V des Sensorischen Cortex

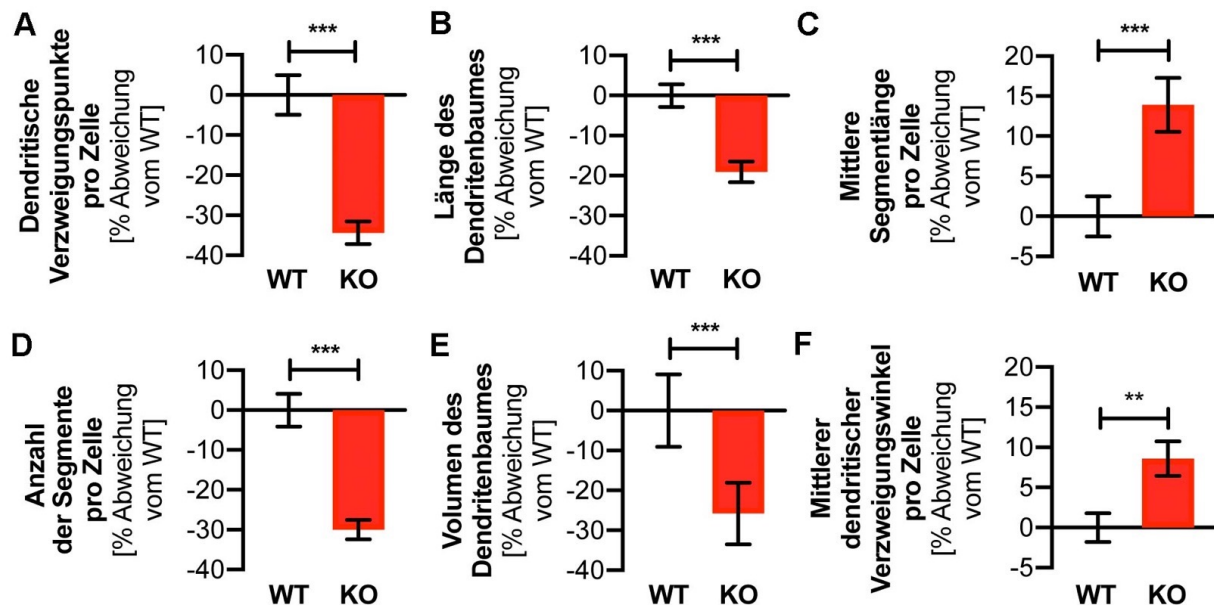


Abbildung 22 Darstellung der relativen Werte verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht II/III des Sensorischen Cortex WT und Abp1-KO-Mäusen

Analog zu Abbildung 17, B-G des Ergebnisteils wurden die prozentualen Abweichungen der Parameter vom Mittelwert des WT auf Signifikanz untersucht. Ausgewertet wurden die Dendritenbäume von Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex in WT (n=92) und Abp1-KO-Mäusen (n=92). Gezeigt ist die prozentuale Abweichung der Mittelwerte der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle (**A**), der Länge der Dendritenbäume (**B**), der Anzahl der Segmente pro Zelle (**D**), der Gesamtvolumina der Dendritenbäume (**E**) sowie der mittleren Verzweigungswinkel pro Zelle (**F**) mittels zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test und der Vergleich der mittleren Segmentlänge pro Zelle (**C**) mittels *student's t*-test.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte aller Einzelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveaus entsprechen ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

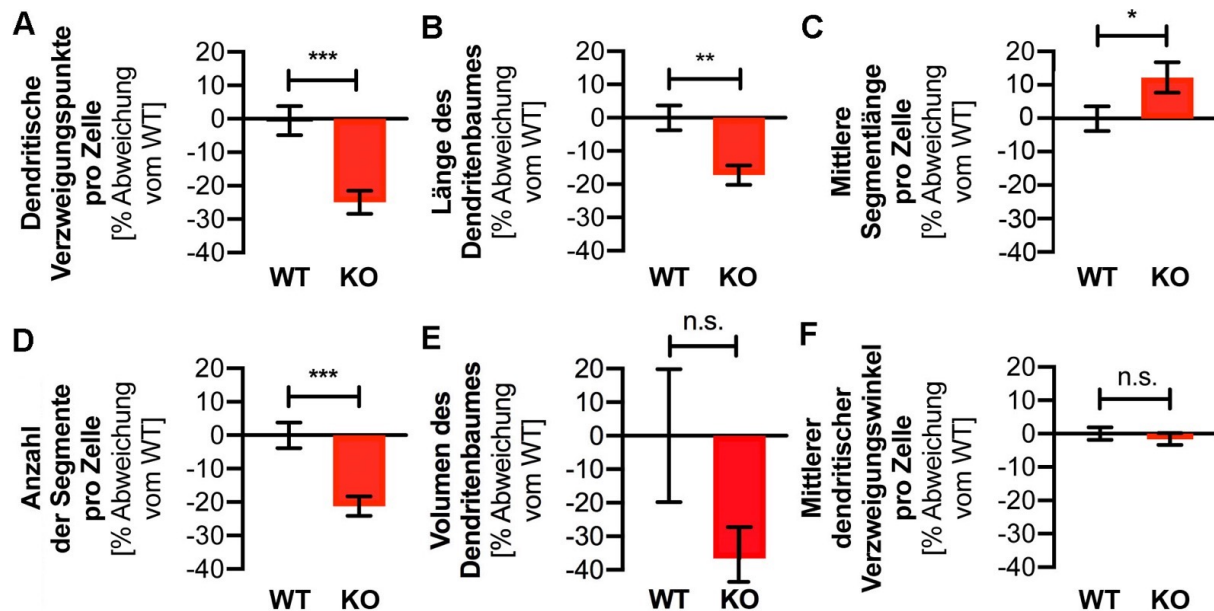


Abbildung 23 Darstellung der relativen Werte verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht V des Sensorischen Cortex WT und Abp1-KO-Mäusen

Analog zu Abbildung 19, B-G des Ergebnisteils wurden die prozentualen Abweichungen der Parameter vom Mittelwert des WT auf Signifikanz untersucht. Ausgewertet wurden die Dendritenbäume von Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex in WT (n=89) und Abp1-KO-Mäusen (n=90). Gezeigt ist die prozentuale Abweichung der Mittelwerte der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle (A), der Länge der Dendritenbäume (B), der mittleren Segmentlänge pro Zelle (C), der Gesamtvolumina der Dendritenbäume (E) sowie des mittleren Verzweigungswinkels pro Zelle (F) mittels zweiseitigen *Mann-Whitney*-Test und der Vergleich der Anzahl der Segmente pro Zelle (D) mittels *student's t*-test vom Mittelwert des WT.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism 7.0*-Software. In allen Grafiken sind die Mittelwerte aller Einzelwerte \pm SEM dargestellt. Signifikanzniveaus entsprechen * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$ und n.s. für nicht signifikante Ergebnisse.

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Sechsschichtiger Aufbau des Sensorischen Cortex.....	6
Abbildung 2	Stadien der Neuromorphogenese dissoziierter hippocampaler Neurone in Kultur	7
Abbildung 3	Morphologie und Klassifikation dendritischer Dornfortsätze.....	9
Abbildung 4	Bildung von F-Aktin aus Aktinmonomeren (G-Aktin) 14	
Abbildung 5	Verzweigung von Aktinfilamenten durch den Arp2/3-Komplex.....	15
Abbildung 6	Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Abp1 im Säugetier	17
Abbildung 7	Verknüpfung der PSD und des Aktincytoskeletts durch Abp1 im postsynaptischen Kompartiment der Dornfortsätze	19
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Parameter der Dendritenbaumanalyse mittels der <i>Imaris8.0</i> -Software	37
Abbildung 9	Darstellung des Prinzips der Analyse nach D. A. Sholl (Sholl 1953). 38	
Abbildung 10	Golgi-gefärbte Aufnahmen des Hippocampus.....	41
Abbildung 11	Vergleich der Expression von Abp1 im Hippocampus von WT- und Abp1-KO-Maus mittels Immunfluoreszenzfärbung	42
Abbildung 12	Vergleich der Dornfortsatzdichten sowie Dichten einzelner Morphologieklassen von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen.....	44
Abbildung 13	Vergleich spezifischer morphologischer Parameter der Dornfortsätze der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen.....	46
Abbildung 14	Darstellung und Vergleich der Expression von Abp1 im Sensorischen Cortex von WT- und Abp1-KO-Maus mittels Immunfluoreszenzfärbung	49
Abbildung 15	Lokalisation von Abp1 in Wachstumskegeln während der Dendritogenese junger muriner Cortexneurone (DIV6)	51
Abbildung 16	Analyse von Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO-Mäusen nach Sholl.....	52
Abbildung 17	Vergleich verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht II/III des Sensorischen Cortex WT und Abp1-KO-Mäusen.....	54
Abbildung 18	Analyse von Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO-Mäusen nach Sholl.....	56
Abbildung 19	Vergleich verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO-Mäusen.....	57

Abbildung 20	Darstellung der relativen Dornfortsatzdichten sowie Dichten einzelner Morphologieklassen von Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen	94
Abbildung 21	Darstellung der relativen Werte spezifischer morphologischer Parameter der Dornfortsätze der CA1 Region des Hippocampus in WT und Abp1-KO-Mäusen	95
Abbildung 22	Darstellung der relativen Werte verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht II/III des Sensorischen Cortex WT und Abp1-KO-Mäusen	96
Abbildung 23	Darstellung der relativen Werte verschiedener Parameter der Dendritenbaumanalyse in Schicht V des Sensorischen Cortex WT und Abp1-KO-Mäusen	97

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete primäre Antikörper	27
Tabelle 2	Verwendete sekundäre Antikörper	27
Tabelle 3	Klassifikation der Dornfortsätze durch das integrierte MATLAB-Modul ..	35
Tabelle 4	Beschreibung und direkte Bezeichnung der untersuchten morphologischen Parameter im Rahmen der Dornfortsatzanalyse	36
Tabelle 5	Statistische Details der Dornfortsatzdichten von WT und Abp1-KO	87
Tabelle 6	Prozentuale Anteile der einzelnen Morphologieklassen an der Dornfortsatzdichte von WT und Abp1-KO	87
Tabelle 7	Statistische Details der Kopfweiten der Dornfortsätze von WT und Abp1- KO	88
Tabelle 8	Statistische Details der Kopfvolumina der Dornfortsätze von WT und Abp1-KO	88
Tabelle 9	Statistische Details der Dornfortsatzlängen von WT und Abp1-KO	89
Tabelle 10	Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO nach Sholl	90
Tabelle 11	Anzahl der Verzweigungslevel pro Zelle in Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO	91
Tabelle 12	Statistische Details der Dendritenbaumanalyse aus Schicht II/III des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO	91
Tabelle 13	Analyse der Dendritenbäume der Pyramidenzellen der Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO nach Sholl	92
Tabelle 14	Anzahl der Verzweigungslevel pro Zelle in Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO	93
Tabelle 15	Statistische Details der Dendritenbaumanalyse aus Schicht V des Sensorischen Cortex von WT und Abp1-KO	93

9.5 Danksagung

Am Ende meines Weges zur Fertigstellung meiner Dissertation möchte ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Britta Qualmann sowie Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Kessel aufrichtig danken. Sie haben mir die Möglichkeit zur Bearbeitung meines Themas gegeben und mich stets mit ihrer umfassenden Betreuung, konstruktiven Kritik und einem offenen Ohr begleitet.

Auch möchte ich mich bei allen Gutachtern bedanken, die durch ihre fachliche Qualifikation zur Bewertung meiner Arbeit beitragen.

Durch die finanzielle Unterstützung des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) konnte ich mich sechs Monate lang uneingeschränkt dem experimentellen Teil der Arbeit widmen. Dafür gilt mein Dank den Mitgliedern um Vorstand Prof. Dr. med. Otto Witte und allen Förderern.

Mein persönlicher Dank gilt ebenso Frau Dr. rer. nat. Nicole Koch, die mich durch ihre kompetente Anleitung und Mühe an mein Thema und das wissenschaftliche Arbeiten heranführte. Ihre Anregungen und Kritik waren mir stets eine Hilfe und wichtiger Bestandteil während des Erstellens meiner Arbeit.

Ein Dank gilt auch Michaela Öhler für die Präparation der Neuronenkulturen und die methodische Hilfe bei der Golgi-Färbung und dem Schneiden der Gehirne.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. rer. nat. Jaqueline Schneider, Jule Müller und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die nette Hilfe bei methodischen Fragen sowie für die wertvollen Diskussionen meiner Ergebnisse danken. Es hat mir viel Freude bereitet, mit Euch zu arbeiten.

Danken möchte ich auch Florian Buhler, der mir durch seine technische Hilfe in der Stunde der Not geholfen hat.

Ich danke des Weiteren meinen Freunden Franziska Schuster und Murat Aktas sowie meiner Mutter Gabi Kraus für ihre Unterstützung bei der Suche nach Schreibfehlern. Ebenso danke ich ihnen, Tabea Barthel und Matthias Jahn für ihre offenen Ohren und die ständige emotionale Unterstützung während der Fertigstellung meiner Arbeit. Zuletzt möchte ich meiner lieben Familie danken, die mich immer unterstützt, egal ob emotional oder finanziell. Hierbei möchte ich besonders meinen Vater Dr. med. Michael Kraus erwähnen, der meinen Weg in die Medizin bereitet hat und mir täglich die Chance gibt, aus seinem wertvollen Erfahrungsschatz lernen zu dürfen.

Danke.

9.6 Lebenslauf in tabellarischer Form

Persönliche Daten

Name	Luisa Mona Kraus
Geboren	am 03.01.1994 in Bamberg
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig
Anschrift	Johann-Burkard-Straße 7 96231 Bad Staffelstein
Email-Adresse	luisa.m.kraus@web.de
Telefonnummer	+49 171 838 7755

Schulausbildung

09/2000 – 07/2004	Adam-Riese-Grundschule Bad Staffelstein
09/2004 – 06/2012	Meranier-Gymnasium Lichtenfels
06/2012	Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (1,2)

Studium

seit 10/2012	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2014	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1,5)
10/2015 – 04/2016	Forschungssemester im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Cytoskelett, Prof. Dr. Britta Qualmann, Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena
10/2015 – 04/2016	Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF)
04/2017	<i>United States Medical Licensing Examination</i> (USMLE) Step 1 (Score 210)

Medizinisch-Praktische Erfahrung

08/2010	Hospitation in der Klinik für Neurochirurgie des RegioMed Klinikums Lichtenfels im Rahmen eines schulischen Praktikums
02/2015 – 03/2015	Famulatur in der Hausärztlichen Versorgung, Dipl.-med. Maria Hünermund, Ebensfeld
08/2015 – 09/2015	Famulatur in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Sana-Klinikums Bergen
08/2016 – 09/2016	Famulatur in der Klinik für Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums Kingston, Jamaika
03/2017 – 04/2017	Ambulante Famulatur in der Gynäkologischen Praxis von Dr. med. Ulfert Holtkamp, Lübeck

Soziales Engagement

seit 10/2013	Studentische Tutorin für den Präparierkurs und Repetitorien am Institut für Anatomie I des Universitätsklinikums Jena
seit 04/2016	Studentische Mentoren des Projekts „Aufklärung gegen Tabak“
seit 10/2016	Mentorin für internationale Studierende und geflüchtete Studierende

9.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. rer nat Britta Qualmann, PD Dr. rer nat Michael Kessels, Dr. rer nat Nicole Koch, Michaela Öhler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 15.11.2017

Unterschrift Luisa Mona Kraus